Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. P. Naumann

Fehler, Fehleranalyse und statistische Qualitätskontrolle bei der Antibiotikakonzentrationsbestimmung mit Hilfe der Agardiffusionsmethode

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Lutz Thomas

~~1986~~
1985

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0081

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. P. Naumann

Fehler, Fehleranalyse und statistische Qualitätskontrolle bei der Antibiotikakonzentrationsbestimmung mit Hilfe der Agardiffusionsmethode

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Lutz Thomas

1985

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
gez. Prof. Dr. med. A. Hopf

Referent: Prof. Dr. med. H. Ros

Korreferent: Prof. Dr. med.
H. J. Jesdinsky

Mündliche Prüfungen am 16. und 17. April 1986

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Peter Naumann, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf, danke ich für seine wohlwollende Unterstützung und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. med. Harry Rosin danke ich recht herzlich für die Oberlassung des Themas und für seine fördernde Hilfsbereitschaft bei der Betreuung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Die Agardiffusionsmethode	2
3. Meßfehler und Fehlerarten	4
4. Material und Methode	5
4.1 Konventionelles Verfahren (Lochplattenverfahren)	5
4.1.1 Verwendete Materialien und Geräte	5
4.1.2 Darstellung der Technik zur Herstellung der Agargußplatten	6
4.1.3 Herstellung der Eichprobenlösungen	7
4.1.4 Darstellung der Technik zur Beschickung der Agargußplatte und zur Auswertung der Hemmhöfe	9
4.1.5 Erstellung einer Eichkurve	10
4.1.5.1 Zur grafischen Darstellung der Eichkurve	11
4.1.5.2 Zur algebraischen Darstellung der Eichkurve	14
4.2 Spezielle Experimente	15
4.2.1 Zur Abhängigkeit der Größe der Hemmhoffläche von der Wasserstoffionenkonzentration Lösungsmittels der Proben	15
4.2.2 Zum Einfluß ikterischen Serums auf die Aktivität des Gentamicins	16
4.2.3 Zu den Meßfehlern bei der Herstellung von Eichprobenlösungen (Volumenfehler der Pipetten)	16

Seite

4.3 Fehlerrechnung 17

4.3.1 Verfahren zur Ermittlung der Meßfehler: Schätzung der Fehler m_{x_S} bei der Herstellung der Eichprobenlösungen mit Hilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetzes (FFG)

4.3.2 Berechnung des mittleren fortgepflanzten Fehlers m_{x_p} bei der Konzentrationsbestimmung einer Probe P 19

4.3.3 Die Schätzung der Vertrauensgrenzen (fiducial limits) L_1, L_2 beim Konzentrationswert x_p einer Probe P 25

4.4 Statistische Qualitätskontrolle 28

5. Ergebnisse 32

5.1 Ergebnisse zu 4.1.4 32
5.2 Ergebnisse zu 4.1.5.2 32
5.3 Ergebnisse zu 4.2.1 38
5.4 Ergebnisse zu 4.2.2 43
5.5 Ergebnisse zu 4.2.3 50
5.6 Ergebnisse zu 4.3.1 51
5.7 Ergebnisse zu 4.4 52

6. Diskussion 61

6.1 Diskussion zur Durchführung der Agardiffusionsmethode 61
6.2 Diskussion zur Auswertung der Meßdaten und zur Konzentrationsbestimmung 66
6.3 Diskussion zur statistischen Qualitätskontrolle 69

7. Zusammenfassung 74

8. Anhang I (Programmauflistung) 75
Anhang II (Darstellung der Eichprobenherstellung)

9. Literaturverzeichnis 76

1. Einleitung

In Studien, die in den USA und Großbritannien durchgeführt wurden, sind große Ergebnisabweichungen bei der Konzentrationsbestimmung antibiotikahaltiger Untersuchungsproben mit der Agardiffusionsmethode festgestellt worden (24, 29, 33).

Da es auch in Deutschland noch kein verbindlich standardisiertes Verfahren der Agardiffusionsmethode (ADM) für die Laboratorien gibt, ist zu vermuten, daß bei entsprechenden Ringversuchen die Ergebnisabweichungen ähnlich groß sein würden.

Die Arbeit verfolgt daher drei Ziele:

1. die Zuverlässigkeit der unter standardisierten Bedingungen angewandten ADM im Lochplattenverfahren mit Hilfe der Fehlerrechnung und statistischer Methoden zu beurteilen,
2. ein Modell zur statistischen Qualitätskontrolle für die routinemäßige Konzentrationsbestimmung zu erarbeiten und
3. Kontrollmaßnahmen für die routinemäßige Konzentrationsbestimmung mit der ADM zu empfehlen.

Obwohl für Konzentrationsbestimmungen von Antibiotika heute z. T. moderne, zeitsparende Methoden (z. B. HPLC, FIA) zur Verfügung stehen, gilt die ADM als das traditionelle Referenzverfahren für alle methodischen Neuentwicklungen.

2. Die Agardiffusionsmethode (ADM)

Die ADM ist eine quantitative Analysemethode zur Konzentrationsbestimmung biologisch wirksamer Substanzen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch die Prüfung der biologischen Wirksamkeit der Untersuchungsprobe im Vergleich zur Wirksamkeit eines homologen Standards. Als biologischer Indikator wird ein empfindlicher Bakterienstamm eingesetzt, an dem die antibakterielle Effektivität des Antibiotikums aus der Untersuchungsprobe wie aus der Referenzprobe unter für beide Proben gleichen Bedingungen gemessen wird.

Erste Hinweise zur ADM sind in der Arbeit von ABRAHAM, CHAIN, FLOREY et al. (1) zu finden. Die Methode dient neben dem von FLEMING 1929 entwickelten Reihenverdünnungstest (zit. nach 1) ausschließlich der Aktivitätsbestimmung des Penicillins in wäßrigen Lösungen. Anstatt in ausgestanzte Löcher wird die penicillinhaltige Lösung jedoch in kleine, kreisrunde Prozellanzylinder gefüllt, nachdem diese vorsichtig auf die Agarschichtoberfläche aufgesetzt worden sind, und zwar so, daß die später inokulierte, antibiotikumhaltige Lösung zwischen unterem Zylinderrand und Agarschichtoberfläche nicht ausfließen kann, sondern in die testkeimhaltige Agarschicht diffundiert und infolge des antibakteriellen Effektes eine kreisrunde Hemmzone um den Zylinder ausbildet. Der verwendete, testkeimhaltige Nähragar wird ursprünglich in normale Petrischalen abgefüllt. Zwar erkennen ABRAHAM et al. (1), daß die Resultate nicht nur von der Konzentration der inokulierten Penicillinlösung abhängen, sondern ebenso von der Dichte der Bakterieneinsaat sowie von der Länge der Inkubationsdauer und der Art des verwendeten Lösungsmittels, doch sind die zur Verfügung stehenden, technischen Arbeitsmittel noch so unvollkommen, daß die Genauigkeit der Ergebnisse sehr zu wünschen übrig läßt. Trotzdem vermuten die Autoren, daß der Fehler bei der Konzentrationsbestimmung nicht

größer als 25 % vom ermittelten Wert ist. In der Folgezeit beschäftigen sich mehrere Wissenschaftler mit der ADM. COOPER, GILLESPIE, HUMPHREY, LIGHTBOWN, LINTON, VESTERDAL und WOODMAN (5, 6, 7, 8, 9, 14, 32) untersuchen die Diffusionseigenschaften von Kristallviolett, Penicillin, Neomycinsulfat und Streptomycin in Abhängigkeit von der Dauer der Vordiffusionszeit, der Inkubationstemperatur und -dauer mit dem Ziel, die Vorgänge bei der Hemmhofentstehung zu erklären. MITCHISON und SPICER (22) beschreiben eine ADM in Glasröhrchen zur Konzentrationsbestimmung von Streptomycin. Die von ihnen statistisch geschätzten Fehler bei der Konzentrationsbestimmung liegen bei maximal 27 % vom ermittelten Wert. Bei KLEIN (17) sind verschiedene Modifikationen der ADM ausführlich beschrieben. ROSIN et al. (28) stellen die bisher jüngsten Verbesserungen der ADM vor. Das dort beschriebene Verfahren wird den eigenen weiterführenden Untersuchungen zugrunde gelegt.

3. Meßfehler und Fehlerarten

Jeder Meßvorgang, der im Rahmen eines Experimentes abläuft, ist mit Fehlern behaftet.

Als Fehler sollen hier alle Einflüsse auf die ermittelten Meßwerte bezeichnet werden, die ein Abweichen vom wahren, aber unbekannten Wert einer Größe verursachen.

Die Ursachen, die während des Meßvorganges eine Abweichung vom wahren Wert bedingen, bleiben häufig verborgen. Die Erfahrung lehrt jedoch, daß sie bei jedem Meßvorgang wirksam sind.

Es ist zwischen grobem Fehler, systematischem und zufälligem Fehler zu unterscheiden. Der grobe Fehler läßt sich leicht erkennen und daher bei ausreichender Sorgfalt im Experiment vermeiden. Er ist in den folgenden Ausführungen nicht Gegenstand der Untersuchungen. Der systematische Fehler ist durch die Konstruktion des Meßgerätes, durch die Verstellung der für den Meßvorgang wichtigen Teile am Meßgerät oder durch eine dem Beobachter eigentümliche Verhaltensweise beim Meßvorgang bedingt. Er tritt bei jedem Meßvorgang auf, d. h., er ist regelmäßig. Seine Größe ist in etwa konstant oder ändert sich gesetzmäßig. Systematische Fehler sind in der Regel einseitig wirkende Fehler. Solche regelmäßigen Fehler sind grundsätzlich vermeidbar durch sorgfältige Kontrolle und Eichung der Meßgeräte sowie durch vorschriftsmäßiges Verhalten des Experimentators beim Meßvorgang. Häufig lassen sich systematische Fehler in zufällige Fehler transformieren, und zwar durch Austausch der Meßgeräte bzw. des Experimentators. Der zufällige Fehler dagegen tritt unregelmäßig auf und streut in seiner Größe. Er läßt sich deshalb nicht gesetzmäßig erfassen. Für ihn ist daher ein Verfahren zu seiner Erkennung und eine Methode zur Abschätzung seiner Größe erforderlich. Ein einfaches Verfahren, den zufälligen Fehler zu entdecken, ist die Mehrfach-

messung ein und derselben Größe. Aus einer solchen Meßprobenreihe (Stichprobe) läßt sich dann der mittlere zufällige Fehler schätzen, der mit seinen Grenzen den Bereich angibt, in dem mit großer Wahrscheinlichkeit der unbekannte, wahre Wert einer Größe liegt.

4. Material und Methode

4.1 Konventionelles Verfahren (Lochplattenverfahren)

4.1.1 Verwendete Materialien und Geräte

Für die Herstellung der Agargußplatten und der Eichproben sowie für die Ausmessung der Hemmhofdurchmesser werden folgende Materialien und Geräte eingesetzt:

a) Mueller-Hinton-Agar aus einer Herstellungscharge der Firma OXOID als Nährmedium,
b) Bacillus subtilis (ATCC 6633) als Indikator,
c) abdeckbare, plangeschliffene Glasküvetten mit den Innenmaßen: Länge 260 mm, Breite 150 mm, Höhe 20 mm,
d) ein Gießtisch mit Tariereinrichtung,
e) ein Wärmeschrank, 60° C,
f) ein Wasserbad, 60° C,
g) Bunsenbrenner,
h) Vollpipetten verschiedener Volumina,
i) verschiedene sterile Glasgefäße (Erlenmeyer-Kolben, Meßzylinder, Glasröhrchen usw.),
j) Korkbohrer,
k) Skalpelle,
l) Saugpapier,
m) ein Kühlschrank oder Kühlraum, 4° C,
n) ein Brutschrank oder Brutraum, 37o C,
o) ein Stereomikroskop mit Visiereinrichtung,
p) Phosphatpuffer nach Sörensen,

q) Poolserum, frei von antibakterieller Eigenaktivität,
r) Gentamicin, Firma E. MERCK, Chargen 71-11-25,
72-05-15/1-K-5/18, 78-02/K 26228.

4.1.2 Darstellung der Techniken zur Herstellung der Agargußplatten

Es werden stets größere Vorräte von Mueller-Hinton-Agar, pH 7,8, vorgelöst, zu je 80 oder 100 ml in Erlenmeyer-Kolben abgefüllt, übersterilisiert und bei 4° C bis zum Ansatz gelagert. Bei Bedarf wird das Nährmedium dann im Wasserdampfbad frisch aufgelöst. Dem verflüssigten Nährboden wird nach Abkühlung auf etwa 70° C 0,75 oder 1,0 ml der Testkeimsuspension zugesetzt. Diese wird ebenfalls in größerer Menge in konstanter Konzentration von $2{,}4 \times 10^7$ Bakterien/ml Suspension in zahlreichen tiefgefrorenen Portionen vorrätig gehalten. Bei Bedarf wird eine Portion aufgelöst und im Verhältnis 1:10 mit sterilem Aqua dest. gebrauchsfertig verdünnt. Die optimale Einsaatdichte im Nähragar beträgt ca. 7500 Sporen/ml. Diese Suspension wird luftblasenfrei in eine auf ca. 70° C vorgewärmte, sterile Glasküvette ausgegossen. Die Glasküvette steht dabei auf einem Tisch mit einer in der waagerechten Ebene tarierbaren, plangearbeiteten Marmorplatte. Die stets vorjedem Gießen neu durchgeführte Korrektur der Gießtischplatte in die horizontale Ebene erfolgt mittels einer geeichten Libelle und ist zusammen mit dem Planschliff der Küvettenbodenplatte ein wichtige Voraussetzung für eine stets ausreichend gleichmäßig dicke Nährbodenschicht in der Küvette. Anschließend wird die Gußplatte mit einer Glasscheibe abgedeckt. Zwischen Küvette und Abdeckplatte befindet sich ein über den Rand der Platte herausragender Bogen Saugpapier, der verhindert, daß Kondenswasser auf die Nährbodenoberfläche abtropft, das sich auf der Unterseite der Abdeckplatte nach

Erkalten des Nährbodens bildet. Nach etwa 20 Minuten ist die Nährlösung zu einem festen Nährboden erstarrt. Bearbeitungsfähig, d. h. stanzfähig ist das Medium jedoch erst nach weiterer Abkühlung von 1 bis 2 Stunden bei Kühlschranktemperatur.

4.1.3 Herstellung der Eichproben

Für die Eichproben werden drei Fläschchen mit Trockensubstanz des Antibiotikums Gentamicin aus drei verschiedenen Chargen desselben Herstellers verwendet. Die Fläschchen enthalten Gentamicinsulfat in einer analytischen Einwaage von 100 mg antibakteriell aktiver Gentamicin-Base. Der gesamte Fläschcheninhalt wird in 10 ml Pufferlösung (pH-Wert 7,8) gelöst. Hierzu wird jeweils eine andere sterile Vollpipette benutzt. Auch für die nachfolgenden Verdünnungsschritte werden jeweils neue Pipetten eingesetzt. Vor jedem Pipettierschritt wird die verwendete Pipette mit der von ihr zu pipettierenden Lösung benetzt. Aus dieser Stammlösung werden Eichproben zu jeweils 50 ml in Poolserum hergestellt. Insgesamt resultieren aus den geometrischen Verdünnungsreihen 21 verschiedene Eichproben mit den in Tabelle 1 aufgeführten Konzentrationen. Hiervon werden 18 Eichproben mit den Konzentrationen 0,25; 0,3125; 0,625; 1; 1,25; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 32 und 40 mg/l für die Eichkurvenanalyse ausgewählt. Im Konzentrationsbereich 1 bis 10 mg/l, dem therapeutischen Bereich von Gentamicin, liegen die Eichproben dicht gestaffelt. Die übrigen Eichproben dienen dazu, festzustellen, ob sich der Verlauf der Eichkurve außerhalb des therapeutischen Konzentrationsbereiches deutlich ändert. Der größte Teil der Eichproben wird zu je 1 ml portioniert und bei -20° C tiefgefroren. Ein kleinerer Teil wird bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

Testsubstanzprobe Gentamicin	fiktive Konzentrationen der Eichproben in mg/l							
Charge 1	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Charge 2	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Charge 3			12	6	3	1,5	0,75	

Tab. 1: Gestaffelte Anordnung der fiktiven Eichprobenkonzentrationen

4.1.4 Aufgabe der Eichprobe und Ausmessung der Hemmhofdurchmesser

An zehn aufeinanderfolgenden Tagen wird je eine Agargußplatte mit den ausgewählten 18 Eichproben unter konstanten Bedingungen beschickt. Jeweils am Vortag des Ansatzes wird die Glasküvette in schon beschriebener Weise mit dem Nährboden plus Testkeim beschickt und bei 4° C aufbewahrt. Nach dem Ausstanzen der Inokulationslöcher mit Hilfe eines sterilen Korkbohrers wird unter Verwendung von Zufallszahlen jeder der 18 0,1-ml-Proben eine bestimmte Position auf der Gußplatte zugeordnet. Anschließend wird die Küvette auf dem Gießtisch zur Vordiffusion der inokulierten Antibiotikumlösungen zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Vordiffusion dient der Ausbildung möglichst großer, scharf begrenzter Hemmhöfe. Nach Ablauf der Vordiffusionszeit wird die Platte für 18 Stunden bei 37° C inkubiert. Jetzt wachsen die Testkeime in allen Bereichen des Nährbodens, in denen nur subinhibitorische Konzentrationen des Antibiotikums vorliegen. Es resultieren kreisförmige Hemmhöfe um die Stanzlöcher.

Die Hemmhofdurchmesser werden unter einem ZEISS-Stereomikroskop in horizontaler und vertikaler Richtung ausgemessen, der entsprechenden Eichprobe zugeordnet und tabellarisch aufgelistet. Der auszumessende Hemmhof wird mit dem Varioobjektiv des Mikroskopes so eingestellt, daß der Hemmhofrand und der Gesichtsfeldrand zur Deckung kommen. Das okulare Fadenkreuz liegt dadurch stets im geschätzten Mittelpunkt des Hemmhofes. Die Küvette, die auf einem speziellen, der Größe der Gußplatte entsprechenden Kreuztisch (Kreuztisch KT 200/50, Fa. WERTH, Gießen) Platz findet, läßt sich mit Hilfe des seitlich am Kreuztisch angebrachten Nonius aus dem eingestellten Mittelpunkt zentrifugal zum linken Hemmhofrand hin verschieben. Ein am Kreuztisch angeschlossenes elektroni-

sches Zählgerät (DIGIMY ZN 4, Fa. WERTH) zeigt die horizontale und vertikale Koordinatenverschiebung des Kreuztisches in Millimeter bis auf drei Nachkommastellen an. Es wird durch Nullstellung geeicht und der Kreuztisch mit der darauf befindlichen Gußplatte in die entgegengesetzte Richtung soweit bewegt, bis der gegenüberliegende Hemmhofrand mit dem Fadenkreuz zur Deckung gebracht ist. Diese Ortsverschiebung der Küvette wird auf dem Zählgerät angezeigt und stellt den gemessenen Hemmhofdiameter einer Achse dar.

Die Meßdaten werden so, wie sie die Digitalanzeigte des Zählgerätes angibt, mit drei Stellen hinter dem Komma notiert, obwohl sie mit einem mittleren Fehler behaftet sind, der in der Größenordnung von +/- z 10^{-1} mm liegt. Ein Auf- und Abrunden verbietet sich, da die Daten für die Berechnung des Eichkurvenverlaufes weiter verwendet werden. Dagegen werden für die grafische Darstellung nur gerundete Meßwerte bzw. deren arithmetische Mittelwerte mit einer Stelle hinter dem Komma benutzt.

4.1.5 Erstellung einer Eichkurve

4.1.5.1 Grafische Darstellung der Eichkurve

In Abbildung 1 wird y:= Hemmhofdurchmesser, gemessen in mm, gegen x:= Konzentration, gemessen in mg/l, in einem kartesischen Koordinatenkreuz mit linearen Leitern aufgetragen. Die aus den Wertepaaren (x,y) resultierende Bildkurve entspricht am ehesten einer Logarithmusfunktion der allgemeinen algebraischen Form

$$y = a + b\log x \qquad (1)$$

Eine Lineartransformation (lineare Bildkurve) wird erreicht durch die Abtragung der logarithmierten x-Werte auf der Abszisse. Da die Ablesegenauigkeit aus einer logarithmischen Kurve geringer und bei großen Konzentrationsbereichen eine logarith-

mische Skalierung raumsparender ist, werden in Abbildung 2 die Datenpaare (x,y) in ein abszissenlogarithmisches Funktionspapier eingetragen. Danach stellt sich die Bildkurve der Logarithmusfunktion (Gl. 1) als Gerade mit der Geradengleichung

$$y' = n + mx' \qquad (1.1)$$

dar. Da die Abszisse eine logarithmische Funktionsleiter ist, auf der die Argumente x in Abständen logx, bezogen auf eine Einheitsstrecke l_x, auf der Abszisse abgetragen sind, erhält die Gleichung (1.1) unter Berücksichtigung der Einheitsstrecke die Form

$$l_y \cdot y = l_y n + l_x m \cdot \log x \qquad (1.2)$$

Die Einheitsstrecke der logarithmisch geteilten Koordinatenachse des verwendeten Funktionspapieres (SELECTA, Nr. 373 1/2 A3) beträgt 9 cm.

Die Empfindlichkeit des Testkeimes gegenüber dem Antibiotikum wird durch den Regressionskoeffizienten $b = l_x m$ repräsentiert.

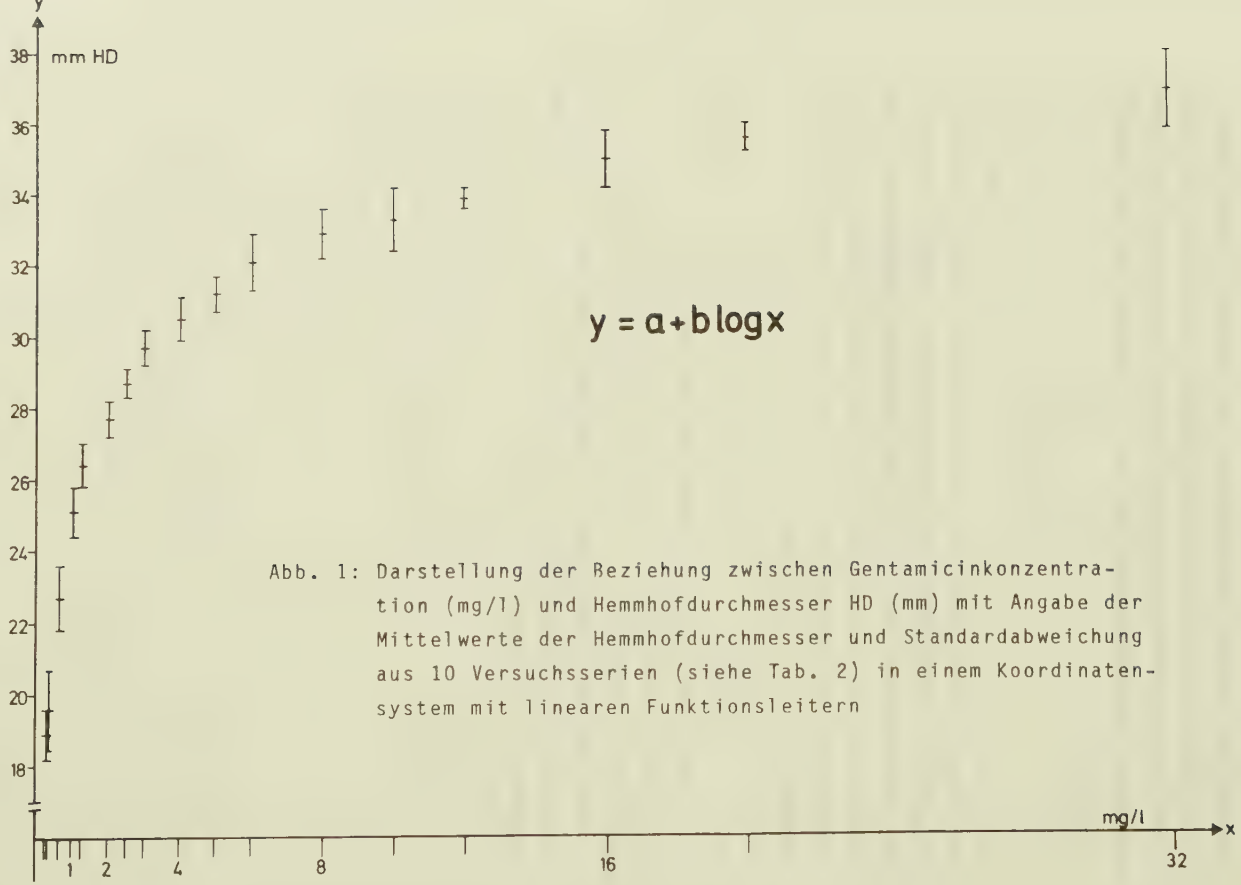

Abb. 1: Darstellung der Beziehung zwischen Gentamicinkonzentration (mg/l) und Hemmhofdurchmesser HD (mm) mit Angabe der Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser und Standardabweichung aus 10 Versuchsserien (siehe Tab. 2) in einem Koordinatensystem mit linearen Funktionsleitern

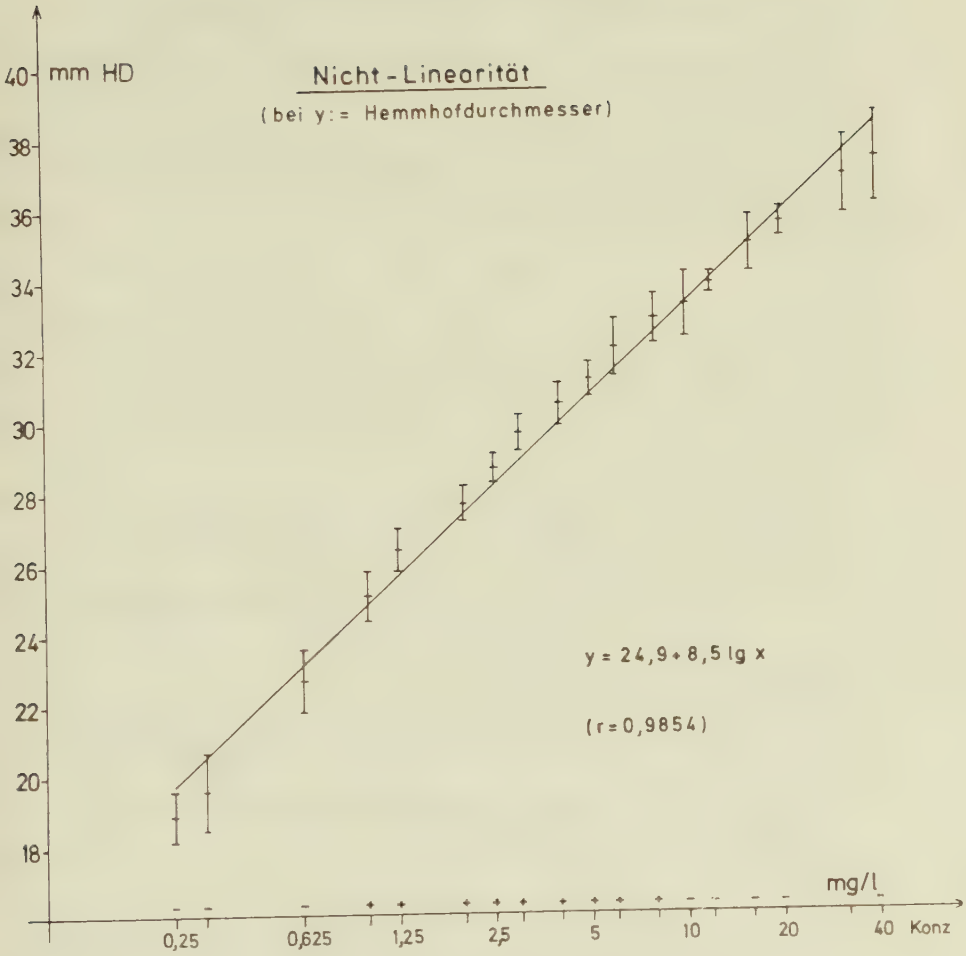

Abb. 2: Darstellung der Beziehung zwischen Gentamicinkonzentration (mg/l) -logarithmische Funktionsleiter auf der Abszisse- und Hemmhofdurchmesser HD (mm) mit Angabe der Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser und Standardabweichung aus 10 Versuchsserien (siehe Tab. 2)

4.1.5.2 Zur algebraischen Darstellung der Eichkurve

Die Eichkurvenparameter a (Achsenabschnitt) und b (Regressionskoeffizient) werden nach der Methode der kleinsten Quadrate mit einem programmierbaren Taschenrechner ermittelt (Programm LINREG im Anhang I). Die Gleichung für die Regressionsgerade lautet

$$y = \bar{y} + b(\log x - \overline{\log x}) \qquad (2)$$

Die Regressionsgerade gilt nur für den Konzentrationsbereich, der durch die Eichprobenkonzentrationen abgedeckt ist.

Der Rechner ermittelt über das Programm LINREG folgende Regressionskenndaten:

a) die Anzahl der Gruppen (m),
b) die Anzahl der Einzelmeßdaten des Standards (n_S),
c) den arithmetischen Mittelwert der dekadisch logarithmierten Eichprobenkonzentrationswerte ($\overline{\lg x}_S$),
d) den arithmetischen Mittelwert ($\bar{y}_S$) der Hemmhofdurchmesserwert bzw. quadrierten Hemmhofdurchmesserwerte
e) den Regressionskoeffizienten (b),
f) den Achsenabschnitt (a),
g) die Varianz der logarithmierten Eichprobenkonzentrationswerte (s^2_{lgx}),
h) die Varianz der Hemmhofdurchmesserwerte bzw. quadrierten Hemmhofdurchmesserwerte (s^2_y),
i) die Kovarianz (s_{lgxy}),
j) den Korrelationskoeffizienten (r),
k) die Summe der quadratischen Abweichungen von der errechneten Geraden ($SQ_{y \cdot x}$),
l) die Summe der quadratischen Abweichungen der Gruppenmittelwerte von der errechneten Regressionsgeraden (SQ_1),

m) die Summe der quadratischen Abweichungen innerhalb der Gruppen (SQ_2),
n) die Restvarianz ($s^2_{y \cdot lgx}$).

4.2 Spezielle Experimente

4.2.1 Zur Abhängigkeit der Größe der Hemmhöfe von der Wasserstoffionenkonzentration des Lösungsmittels der Proben

Im folgenden Versuch wird die Veränderung des Serum-pH-Wertes der Eich- und Kontrollproben in Abhängigkeit von der Lagerzeit sowie der Einfluß dieser veränderten Wasserstoffionenkonzentrationen des Serums auf die Hemmhofgröße untersucht.

Die aus gepooltem Serum hergestellten Gentamicin-Eich- und Kontrollproben haben am Tag der Probenherstellung einen pH-Wert von 8,59. Ein Teil der Eich- und Kontrollproben wird in Portionen von je 1 ml bei einer Temperatur von -20° C tiefgefroren. Gleichzeitig werden aus derselben Charge mehrere Standardeichproben und Kontrollproben bei Kühlschranktemperatur (ca. 4° C) verschlossen aufbewahrt.

Am Tage der Probenherstellung und bei jeder der folgenden pH-Kontrollmessungen werden die verwendeten Probenlösungen auf bakterielle Kontamination überprüft. Mit Bakterien verunreinigte Proben werden nicht zur pH-Bestimmung herangezogen, da allein durch den Bakterienstoffwechsel der Serum-pH-Wert verändert sein würde. Um den Einfluß von pH-Verschiebungen in den Untersuchungsproben auf die Größe der Hemmhöfe festzustellen, wird der pH-Wert am Herstellungstag der Proben und nachfolgend am 15., 30., 60., 90., 180. Tag und nach einem Jahr nach der Probenherstellung kontrolliert.

Am 15. und am 90. Tag nach der Probenzubereitung werden neben den pH-Werten auch die Konzentrationen der gekühlten und der tiefgefrorenen Proben gemessen.

Mit Hilfe des Differenzen-t-Testes (16) werden die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationswerte der gekühlt stehenden Proben mit den Konzentrationsmittelwerten der tiefgefrorenen Proben jeweils als zusammengehörende Datenpaare verglichen.

Mit demselben Test wird untersucht, ob sich die Hemmhofdurchmesser der gekühlten Kontrollproben deutlich von denen der tiefgefrorenen Kontrollproben unterscheiden. Auf insgesamt acht Testküvetten werden je eine gekühlte und eine tiefgefrorene Gentamicin-Kontrollprobe derselben Charge mit einem gekühlt gelagerten und einem tiefgefrorenen Gentamicinstandard (bestehend aus jeweils sechs Eichproben: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mg/l) parallel bestimmt.

4.2.2 Zum Einfluß ikterischen Serums auf die Gentamicin-Aktivität

Zur Klärung der Frage, ob erhöhte Bilirubinkonzentrationen im Serum die Wirksamkeit des Gentamicins einschränken, werden je eine Standardreihe aus normalem Poolserum (Bilirubinkonzentration ca. 8 mg/l) und aus Poolserum ikterischer Patienten (Bilirubinkonzentration 140 mg/l) mit den Eichprobenkonzentrationen 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mg/l sowie je zwei Kontrollproben aus normalem Poolserum und aus Serum mit dem erhöhten Bilirubingehalt hergestellt.

Die Konzentrationen des Gentamicins der vier Kontrollproben werden parallel auf insgesamt sechs Testküvetten mit beiden Standardreihen bestimmt. Die Ergebnisse werden mit Hilfe des Differenzen-t-Testes verglichen.

4.2.3 Zu den Meßfehlern bei der Herstellung von Eichproben

An mehreren Stellen bei der Eichprobenherstellung treten Meßfehler auf, deren Größen experimentell erfaßt werden können. Zu ihnen gehört vor allem der Volumenfehler der verwendeten Vollpipetten.

In dem folgenden Experiment wird untersucht, inwieweit die auf den Vollpipetten angegebenen Toleranzen mit den mittleren Abweichungen übereinstimmen, die anhand durchgeführter Massen-

wägungen von je 10 Messungen mit destilliertem Wasser ermittelt werden. Für jede der 10 Messungen wird eine andere Vollpipette derselben Volumengröße eingesetzt, um den systematischen Volumenfehler der einzelnen Pipette in einen zufälligen Fehler zu transformieren. Sofern der geschätzte mittlere Fehler innerhalb der für jede Pipettengröße angegebenen Toleranz (d. i. die maximale systematische Abweichung) liegt, wird diese als mittlere Volumenabweichung verwendet. Die Untersuchungen werden mit einer METTLER-Feinwaage durchgeführt. Überprüft werden folgende Vollpipettengrößen: 1, 2, 6, 10 und 50 ml Maßvolumen.

4.3 Fehlerrechnung

4.3.1 Verfahren zur Ermittlung der mittleren Meßfehler m_{x_S} bei der Herstellung der Eichproben S (S = Standard)

Bei der Herstellung der Eichprobenlösungen (S) treten Massen-, Volumen- und Fehler bei den Konzentrationen (c_i) auf (siehe Anhang II). Letztere werden mit Hilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetzes (FFG) geschätzt.

Die mittleren Fehler m_{x_S}, die bei der Wirkstoffeinwaage mit der Masse M und den folgenden Verdünnungsschritten durch Überpipettierung auftreten, werden nach dem FFG für jede Verdünnungsstufe ermittelt. Ausgehend vom ersten Verdünnungsschritt, aus dem die erste Konzentrationsstufe

$$c_1 = \frac{M}{V_1} \qquad (3)$$

resultiert, ergeben sich alle folgenden Konzentrationen aus

$$c_i = \frac{M \cdot A_2 \cdot A_3 \cdots A_i}{V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdots V_i} \qquad (3.1)$$

und jeweils dazu unter Berücksichtigung der bereits experimentell ermittelten mittleren Volumenfehler der Vollpipetten die mittleren, fortgepflanzten Fehler $m_{x_{i_S}}$ der einzelnen Konzentrationen nach

$$m_{x_{i_S}} = \pm\sqrt{\left(\frac{dc}{dM} \cdot m_M\right)^2 + \left(\frac{dc}{dV_1} \cdot m_{V_1}\right)^2 + \cdots + \left(\frac{dc}{dV_i} \cdot m_{V_i}\right)^2}$$

Da die Standardsubstanz als analytisch eingewogene Trockensubstanz mit Angabe des antibiotisch aktiven Anteiles vom Hersteller vorgegeben wird, ist m_M, der mittlere Fehler bei der Masse M dem Untersucher unbekannt. Deswegen wird als Abweichung ΔM der Masse M die zehnfache vom Hersteller der Feinwaage angegebene untere Grenze des beim Wägevorgang auftretenden systematischen Massenfehlers angenommen: $\Delta M = 10 \cdot 0{,}05\ mg = 0{,}5\ mg$. An die Stelle des mittleren Massenfehlers m_M tritt hier also ΔM. dc/dM ist die partielle Ableitung der Funktion $c = M/V$ nach der Masse M. dc/dV_i ist die partielle Ableitung dieser Funktion nach dem Volumen V_i. Entsprechend der Abbildung 1 (S. 12) führt die Anwendung dieses Verfahrens zur Abschätzung des mittleren Fehlers bei der Konzentration zur Homoskedastizität, d. h., die Varianzen σ_i^2 der Konzentrationen c_i der einzelnen Eichproben sind gleich groß.

Die Konzentrationen c_i werden bei der folgenden statistischen Auswertung mit x_i bezeichnet, wobei mit x_S die Konzentration des Gentamicinstandards und mit x_p die Konzentration in der Patientenprobe gemeint ist.

Da demnach nicht im Sinne einer "Kalibrierung" von fehlerfreien, festgelegten Eichprobenwerten x_S ausgegangen werden kann, ist es nach JESDINSKY (15a) empfehlenswert, die Varianz

$s^2_{x_S}$ von x_S bei der Ermittlung des Steigungsmaßes b zu berücksichtigen. Dieser Eingriff führt zu einem größeren Wert von b und damit zu einem steileren Verlauf der Regressionsgeraden ($b_{korr} = SP_{yx}/(SQ_x - s^2_{x_S})$). Diese Korrektur würde den Einfluß der Streuung von x_S auf den Verlauf der Regressionsgeraden direkt berücksichtigen und somit die Konzentrationsbestimmung von Patientenproben präzisieren. Da aber die Eichprobenkonzentrationswerte x_S nicht als Meßwerte ermittelbar sind, läßt sich für sie auch kein $s^2_{x_S}$ angeben.

4.3.2 Berechnung des mittleren fortgepflanzten Fehlers s_{x_p} bei der Konzentrationsbestimmung einer Probe P

Da die Hemmhofdurchmesser $y_{S_{ij}}$ streuen, bilden die Datenpaare $(x_{S_i}, y_{S_{ij}})$ eine Punktwolke im kartesischen Koordinatenkreuz. Die Gerade, die diese Punktwolke am besten charakterisiert, wird nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate ermittelt.

Zur Ermittlung des Fehlers $s_{y \cdot x}$

Aus der Oberlegung, die Ausgleichsgerade

$$y = a + bx \tag{4.1}$$

der Punktwolke so anzupassen, daß die Summe der quadratischen Abweichungen $SQ_{y \cdot x}$ von dieser Geraden minimal wird, resultiert für die Gleichung (4.1) der neue Ausdruck

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}). \tag{4.2}$$

Die Abstände von der Geraden, für die $SQ_{y \cdot x}$ minimal wird, sind daher durch

$$y_i - \bar{y} + b(x_i - \bar{x})$$

gegeben und somit auch die Summe der Abstandsquadrate

$$SQ_{y\cdot x} = \sum_{i=1}^{n} \left[(y_i - \bar{y}) - b(x_i - \bar{x}) \right]^2. \qquad (4.3)$$

Wird Gleichung (4.3) ausquadriert, so erhält man für

$$SQ_{y\cdot x} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2 - 2b \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) + b^2 \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2 \qquad (4.4a)$$

$$= SQ_y - \frac{(SP_{xy})^2}{SQ_x} \qquad (4.4b)$$

und für die mittlere quadratische Abweichung der Meßwerte y_i von der Ausgleichsgeraden $y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$ die als Restvarianz bezeichnete Größe

$$s^2_{y\cdot x} = \frac{1}{n-2} \left(SQ_y - \frac{(SP_{xy})^2}{SQ_x} \right) \qquad (4.5)$$

Der mittlere Fehler beim Meßwert y_i in bezug auf die Ausgleichsgerade lautet demnach

$$s_{y\cdot x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left(SQ_y - \frac{(SP_{xy})^2}{SQ_x} \right)} \qquad (4.6)$$

Zur Ermittlung der Fehler s_a und s_b

Die Kurvenparameter a = Achsenabschnitt und b = Steigung, die den Verlauf der Ausgleichsgeraden bestimmen, sind ihrerseits

abhängig von den Meßwerten y_i, so daß zum Zwecke der Fehlerabschätzung bei a und b zunächst die Beziehungen

$$a = f(y_i) \tag{4.7a}$$

und

$$b = f(y_i) \tag{4.7b}$$

formuliert werden können.

Da für

$$a = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i y_i \sum x_i}{n \sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2} \tag{4.8a}$$

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2} \tag{4.8b}$$

gelten, erhält man unter Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes (FFG) für den mittleren Fehler beim Achsenabschnitt a

$$s_a = \pm \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \left(\frac{da}{dy_i}\right)^2 \cdot s^2_{y \cdot x}} \tag{4.9a}$$

$$= s_{y \cdot x} \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \left(\frac{da}{dy_i} \right)^2} \qquad (4.9b$$

$$s_a = s_{y \cdot x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} \qquad (4.9c$$

Auf gleichem Wege gelangt man zum mittleren Fehler beim Steigungsmaß b, der durch

$$s_b = \pm \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \left(\frac{db}{dy_i} \right)^2 \cdot s^2_{y \cdot x}} \qquad (4.10$$

$$= s_{y \cdot x} \sqrt{\frac{n}{n \sum x_i - (\sum x_i)^2}} \qquad (4.10$$

dargestellt wird.
Die Restvarianz $s^2_{y \cdot x}$ und der aus ihr resultierende mittlere Feh

ler $s_{y \cdot x}$ bei den Meßwerten y_i werden vom Programm LINREG errechnet (Register R 32). Die mittleren Fehler s_a und s_b werden mit Hilfe des Programmes FEHLER ermittelt.

Der mittlere Fehler bei der Größe x_p, die nunmehr nach

$$x_p = \frac{y_p - \bar{y}}{b} \tag{4.11}$$

als abhängig von den Größen y_p, $\bar{y}$ und b gilt ($x_p = f(y_p, \bar{y}, b)$), wird unter Einbeziehung der schon formulierten mittleren Fehler bei y_p, $\bar{y}$ und b ebenfalls mit Hilfe des FFG ermittelt.

$$s^2_{x_p} = \left(\frac{dx_p}{d\bar{y}}\right)^2 s^2_{\bar{y}} + \left(\frac{dx_p}{db}\right)^2 s^2_b + \left(\frac{dx_p}{dy_p}\right)^2 s^2_{y \cdot x} \tag{4.12a}$$

$$= \left(\frac{1}{b}\right)^2 s^2_{\bar{y}} + \left(\frac{y_p - \bar{y}}{b^2}\right)^2 s^2_b + \left(\frac{1}{b}\right)^2 s^2_{y \cdot x} \tag{4.12b}$$

$$= \frac{1}{b^2} \left(s^2_{\bar{y}} + s^2_{y \cdot x} + \left(\frac{y_p - \bar{y}}{b}\right)^2 s^2_b\right) \tag{4.12c}$$

$$s_{x_p} = \pm \sqrt{\frac{1}{b^2}\left(s^2_{\bar{y}} + s^2_{y\cdot x} + \left(\frac{y_p - \bar{y}}{b}\right)^2 \cdot s^2_b\right)} \qquad (4.12c)$$

$$= \frac{1}{b} \sqrt{s^2_{\bar{y}} + s^2_{y\cdot x} + x_p{}^2 \cdot s^2_b} \qquad (4.12d)$$

$$s^2_{\bar{y}} = \frac{1}{n} s^2_y \qquad (4.12e)$$

Die mittlere Unsicherheit s_{x_p} bei der Größe x_p wird zusammen mit dem Probengehalt x_p mit Hilfe des Programmes KONZ ermittelt. Die Ergebnisangabe erfolgt mit

$$x_p \pm s_{x_p}.$$

Wird das Ergebnis auf der Basis des statistischen 95%-Signifikanzniveaus nach der t-Verteilung angegeben, so lautet die vollständige Ergebnismitteilung

$$x_p \pm t_{(0.05,\ n-2)}\ s_{x_p}.$$

4.3.3 Die Schätzung der Vertrauensgrenzen (fiducial limits) beim Konzentrationswert x_p einer Probe P

Nach einem von E. C. FIELLER entwickelten Verfahren lassen sich die Vertrauensgrenzen zu einem aus der Regressionsgleichung

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \tag{5.1}$$

ermittelten Konzentrationswert x_p einer Probe P schätzen, wenn der dazugehörige Meßwert y_p vorliegt (19a). Hierzu formt man die Gleichung

$$y_p = \bar{y}_S + b(x_p - \bar{x}_S) \tag{5.2}$$

nach

$$x_p = \bar{x}_S + \frac{(y_p - \bar{y}_S)}{b} \tag{5.3}$$

um.
Für die Schätzung der Vertrauensgrenzen von x_p wird vorausgesetzt, daß y_p ein Meßwert sei, deren Streuung dann $s^2_{y \cdot x}$ wäre. Da die Gleichung (5.2) keinen streng funktionalen Zusammenhang wiedergibt, läßt sie sich auch nicht gleich Null setzen. FIELLER definierte stattdessen eine Zufallsgröße Z mit

$$Z = Y_p - \bar{Y}_S - b(x_p - \bar{x}_S). \tag{5.4}$$

Z selbst hat die Streuung

$$s^2_{y\cdot x}\left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x}_S)^2}{SQ_x}\right).$$

Der Quotient aus Z^2 und der Streuung von Z stellt eine Größe dar, die wie t^2-verteilt ist mit

$$\frac{(Y_p - \bar{Y}_S - b(x_p - \bar{x}_S))^2}{s^2_{y\cdot x}\left(\frac{n+1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x}_S)^2}{SQ_x}\right)} \approx t^2_{n-2} \qquad (5.5)$$

Wird für t ein bestimmtes Signifikanzniveau festgelegt, z. B. 95 %, und diese Gleichung mit y_p und $\bar{y}_S$ nach x_p aufgelöst, so erhält man eine Gleichung zweiten Grades:

$$t^2_{0,05}\cdot s^2_{y\cdot x}\left(\frac{n+1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x}_S)^2}{SQ_x}\right) = (y_p - \bar{y}_S - b(x_p - \bar{x}_S))^2, \qquad (5.6)$$

die sich umformen läßt zu

$$(b^2 - \frac{s^2_{y\cdot x}\, t^2_{o,o5}}{SQ_x})x_p^2 - 2(b(y_p - \bar{y}_S) + \bar{x}_S(b^2 - \frac{s^2_{y\cdot x}\, t^2_{o,o5}}{SQ_x}))x_p +$$

$$((y_p - \bar{y}_S)(y_p - \bar{y}_S + 2b\bar{x}_S) + \bar{x}^2_S(b^2 - \frac{s^2_{y\cdot x}\, t^2_{o,o5}}{SQ_x})$$

$$- \frac{s^2_{y\cdot x}\, t^2_{o,o5}(n + 1)}{n} = 0 \qquad (5.7)$$

Allgemein dargestellt, erhält man die bekannte Form einer quadratischen Gleichung

$$px_p^2 + qx_p + r = 0 \qquad (5.8)$$

Die Koeffizienten p, q und r enthalten konstante Größen, die mit Ausnahme von y_p und $t_{o.o5}$ bereits durch Programm LINREG ermittelt wurden. Das Programm KONZ fordert zur Eingabe von y_p und $t_{o.o5}$ für (n - 2) Freiheitsgrade auf und berechnet die Vertrauensgrenzen L_{x1p} und L_{x2p} nach

$$L_{x1p},\ L_{x2p} = \frac{q \mp \sqrt{q^2 - 4pr}}{2p} \qquad (5.9)$$

Die beiden Lösungsvariablen L_{x1p} und L_{x2p} haben einen asymmetrischen Abstand zu x_p.

Da y_p (Hemmhofdurchmesser der Probe P) in der Regel jedoch einen mittleren Meßwert aus mehreren Ansätzen derselben Probe P darstellt, der seinerseits eine Varianz $s^2_{y\cdot x}/n_p$ besitzt, ergibt sich für die Varianz von Z

$$s^2_Z = s^2_{y\cdot x} \left(\frac{1}{n_p} + \frac{1}{n_s} + \frac{(x_p - \bar{x}_s)^2}{SQ_x}\right) \qquad (5.10)$$

$$= s^2_{y\cdot x} \left(\frac{n_p + n_s}{n_p \cdot n_s} + \frac{(x_p - \bar{x}_s)^2}{SQ_x}\right) \qquad (5.10a)$$

n_p ist die Anzahl der Probenansätze derselben Probe P.
Das Programm KONZ berücksichtigt bei der Berechnung der Vertrauensgrenzen für x_p diese Korrektur.

4.4 Statistische Qualitätskontrolle zur Präzision und Richtigkeit der Ergebnisse beim Lochplattenverfahren

Die statistische Qualitätskontrolle wird mit Richtigkeitskontrollproben (Sollproben) zur Erfassung systematischer (vermeidbarer) und Präzisionskontrollproben zur Erfassung zufälliger (unvermeidbarer) Fehler in Anlehnung an die "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde" (27) durchgeführt. Die Herstellung der Kontrollproben erfolgt analog der Herstellung der Eichproben. Die Sollwerte werden normalerweise mit Hilfe von Referenzlaboratorien festgelegt. Solche waren zu Beginn dieser Studie nicht gegeben -werden aber ab 1985 wahrscheinlich durch INSTAND benannt (15). Deswegen werden die Sollwerte von zwei verschiedenen Kontroll-

proben folgendermaßen ermittelt: Von einer Person werden zwei verschiedene Kontrollproben aus einem Poolserum hergestellt, aus dem nachfolgend die Untersucher dieser Proben jeweils ihre eigenen Gentamicin-Eichproben anfertigen. Vier unabhängig voneinander arbeitende Untersucher ermitteln dann mit Hilfe des Lochplattenverfahrens die Konzentrationswerte der beiden Kontrollproben.

Unter Anwendung statistischer Tests wird geprüft, ob es zulässig ist, die von den Untersuchern ermittelten Konzentrationswerte zu einem gemeinsamen Sollprobenwert für jede Probe zusammenzufassen. Als Entscheidungshilfen dienen die folgenden Tests:

1. der F-Test (Vergleich der Varianzen) und
2. der t-Test (Vergleich der Mittelwerte) (4, 16).

Zur Oberprüfung der Präzision wird neben den beiden Richtigkeitskontrollproben eine Präzisionskontrollprobe in 20 aufeinanderfolgenden Vorversuchen analysiert. Ein Versuch entspricht einem Probenansatz in einer Küvette.

Die aus den jeweils 20 Sollprobenmeßdaten gebildeten Mittelwerte werden in einem modifizierten t-Test (Vergleich von Mittelwert und Sollwert) mit den inzwischen vorliegenden Sollwerten verglichen (16).

Die relative Standardabweichung der gemessenen Konzentrationseinzelwerte der Präzisionskontrollprobe wird mit der in (27) genannten oberen zulässigen Grenze von 5 % verglichen. Mit der (absoluten) zweifachen Standardabweichung wird eine sog. untere und obere Warngrenze, mit der dreifachen Standardabweichung eine sog. untere und obere Kontrollgrenze festgelegt.

Konz. in mg/l	Gußplatte Nr. 1	2	3	4	5	6
40	38.4645	37.6355	37.0175	35.1650	37.5595	37.8205
32	38.2530	36.9110	36.1705	36.8060	37.3065	37.0575
20	36.1585	35.4015	34.8840	35.6100	36.2340	35.4390
16	36.6365	34.6230	34.3750	35.0005	35.1620	35.0510
12	33.6620	34.0685	33.7875	33.7670	34.2075	33.8460
10	33.7190	33.6415	31.2065	33.3280	32.6010	33.4945
8	33.2055	33.0020	32.0295	33.0320	32.6880	34.3425
6	32.1525	30.4440	32.5010	33.3570	32.4525	32.4740
5	31.9670	31.3155	30.8985	31.4870	31.5835	31.3445
4	30.6705	30.5435	29.6950	30.2425	31.5610	31.0145
3	30.2775	29.4815	28.9295	29.8205	29.5320	29.1305
2,5	29.0555	29.2975	28.5790	28.6080	29.3220	28.2370
2	28.2910	27.1260	27.2290	27.2750	27.3725	27.7325
1,25	26.4550	26.4875	25.5055	26.5515	26.5940	26.5255
1	25.3445	24.6695	24.6005	24.6760	24.6190	26.8505
0,625	23.7705	22.3450	20.8870	23.6930	23.6105	21.8595
0,3125	19.6170	18.9805	19.2535	21.4610	18.5230	19.7305
0,25	18.9840	19.1055	19.4990	19.6285	19.2555	18.3160

Tab. 2a): Mittelwerte der in horizontaler und vertikaler Richtung ausgemessenen Hemmhofdurchmesser (mm) der Gentamicin-Eichprobenkonzentrationen (mg/l)

(Fortsetzung auf Seite 31)

Konz. in mg/l	Gußplatte Nr. 7	8	9	10	$\bar{y}_i$	s_i
40	39.6980	35.6920	37.4910	37.6610	37.4205	1.2825
32	38.3990	36.0375	37.0545	34.5170	36.8513	1.1171
20	35.5485	35.8380	35.6950	35.5420	35.6351	0.3875
16	36.2705	34.4220	34.5070	34.2710	35.0319	0.8132
12	34.4060	33.1805	33.6870	34.1290	33.8741	0.3460
10	34.3635	33.2740	32.7405	34.3530	33.2722	0.9278
8	33.2260	32.3685	33.2840	32.0710	32.9249	0.6849
6	32.0705	31.5568	32.4570	31.6320	32.1097	0.7740
5	31.0425	30.7180	31.3575	30.3525	31.2067	0.4646
4	30.5605	29.4020	30.7125	30.4800	30.4882	0.6137
3	30.2480	29.6505	29.3710	30.1145	29.6556	0.4601
2,5	29.0215	28.5825	28.2510	28.1935	28.7148	0.4322
2	28.6335	27.3800	27.6045	28.1290	27.6773	0.5111
1,25	26.8545	25.6050	26.3020	27.6060	26.4487	0.5931
1	25.5270	24.6775	24.4245	25.5040	25.0893	0.7416
0,625	22.7785	22.4860	22.4255	23.2325	22.7088	0.9123
0,3125	19.6115	19.5520	17.8720	21.4000	19.6001	1.1241
0,25	18.6840	18.1150	17.5510	19.4855	18.8624	0.6846

Tab. 2b): Mittelwerte der in horizontaler und vertikaler Richtung ausgemessenen Hemmhofdurchmesser (mm) sowie die jeweiligen Mittelwerte y_i aus allen 10 Ansätzen einschließlich der Standardabweichung s_i der 18 Gentamicin-Eichprobenkonzentrationen (mg/l)

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse zu 4.1.4 (Auswertung der Hemmhöfe)

Die Mittelwerte der in horizontaler und vertikaler Richtung ausgemessenen Hemmhofdurchmesser sind in den Tabellen 2a und 2b aufgelistet. Die Tabellen enthalten die Meßdaten von 10 aufeinanderfolgenden Versuchen mit je 18 Gentamicin-Eichproben.

5.2 Ergebnisse zu 4.1.5.2 (algebraische Darstellung der Eichkurve)

Die in den Tabellen 2a und 2b enthaltenen Meßdaten werden als gruppierte Daten zur Bestimmung einer Eichkurve verarbeitet (Programm LINREG im Anhang). Es resultieren folgende Daten (zu den Abkürzungen siehe Seite 14):

m	=	18
n	=	180
$\overline{lgx}$	=	0,5909
$\bar{y}$	=	29,8651
b_{ylgx}	=	8,4738
a	=	24,8582
s^2_{lgx}	=	0,4063
s^2_y	=	30,0473
s_{lgxy}	=	3,4429
r	=	0,9854
SQ	=	156,2912
SQ_1	=	62,0489
SQ_2	=	94,2423
$s^2_{y.lgx}$	=	0,8780

Die Gleichung der Regressionsgeraden von y (Hemmhofdurchmesser) bezüglich lgx (logarithmierte Konzentration der Eichprobe) lautet:

$$y = 29{,}8651 + 8{,}4738(\lg x - 0{,}5909)$$

Das Konfidenzintervall für den Regressionskoeffizienten ß ist mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 178 Freiheitsgraden geschätzt worden (19) und lautet:

$$8{,}2574 \leqq \beta \leqq 8{,}6903$$

Das Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt α ist mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 178 Freiheitsgraden geschätzt worden und lautet:

$$24{,}6819 \leqq \alpha \leqq 25{,}0342$$

Die Konfidenzbereiche für die Regressionskurve Y sind mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 178 Freiheitsgraden geschätzt worden und lauten für gegebene x-Werte:

x	y	y-l	y+l
0,25	19,7565	19,4639	20,0491
1	24,8582	24,6704	25,0461
2	27,4091	27,2579	27,5603
3,8985	29,8654	29,7278	30,0030
4	29,9960	29,8224	30,0976
6	31,4521	31,3087	31,5956
8	32,5108	32,3576	32,6641
10	33,3320	33,1684	33,4957
16	35,0617	34,8705	35,2529
20	35,8829	35,6766	36,0892
30	37,3751	37,1390	37,6112
40	38,4338	38,1753	38,6923

Tab. 3: Konfidenzbereiche für die Regressionskurve Y

Die Regressionskurve ist auf der Basis eines linearen Regressionsmodells erstellt worden. Mit Hilfe des Testes auf lineare Regression (19) wird überprüft, ob die Regression Y bezüglich X = lgx linear ist (Programm LINREG und TEST LIN im Anhang). Der Prüfquotient lautet:

$$v = 6{,}6663$$

Für $\alpha = 0{,}05$ lautet das 0,95-Quantil der $F_{(16,162)}$-Verteilung $f_{0,95} = 1{,}73$. Die Nullhypothese, daß die Regression Y bezüglich X linear ist, wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0{,}05$ abgelehnt.

Der Kurvenverlauf wird abschnittsweise untersucht. Die Regressionskoeffizienten von 3 Teilkurven (b_1, b_2, b_3) mit den Eichprobenintervallen I (40 - 10 mg/l), II (10 - 2 mg/l) und III (2 - 0,25 mg/l) werden mit dem Regressionskoeffizienten b der Eichkurve verglichen.

Das zusammengesetzte Bild der 3 Teilkurven entspricht eher dem einer logarithmischen Kurve. Das Ergebnis aus dem Vergleich der Teilkurven deutet schon auf den nichtlinearen Verlauf der Regression hin. In Tabelle 5 sind die Parameter der Eichkurve denen der 3 Teilkurven gegenübergestellt.

	$y_{40-0,25}$	y_{40-10}	y_{10-2}	$y_{2-0,25}$
n	18	6	8	6
$\overline{lgx}$	0,5909	1,2819	0,6448	-0,1522
$\overline{y}$	29,8651	35,3475	30,7562	23,3978
b	8,4738	6,8494	8,0848	10,2752
a	24,8582	26,5671	25,5431	24,9620

Tab. 5: Kurvenparameter der Eichkurve und der 3 Segmentkurven I, II und III

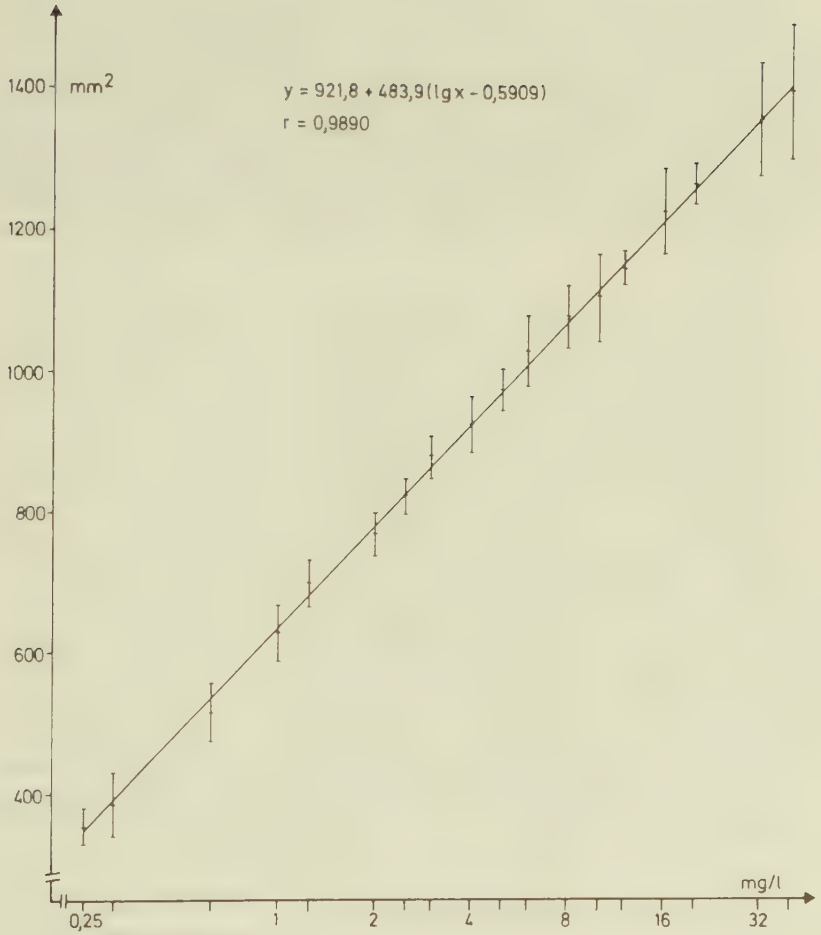

Abb. 3: Darstellung der Beziehung zwischen Gentamicinkonzentration (mg/l) -logarithmische Funktionsleiter auf der Abszisse- und Hemmhofdurchmesser-Quadrat (mm^2) mit Angabe der Mittelwerte der quadrierten Hemmhofdurchmesser und Standardabweichung aus 10 Versuchsserien (siehe Tab. 2)

Eine günstigere Anpassung der Stichprobenpaare (x_i, y_{ij}) an die nach dem Modell der linearen Regression ermittelte Regressionsgerade ergibt sich, wenn statt des Hemmhofdurchmessers als abhängige Variable sein Quadrat gewählt wird (Abb. 3 Die in den Tabellen 2a und 2b enthaltenen Meßdaten werden erneut unter Berücksichtigung der o. g. Empfehlung zur Berechnung einer Eichkurve verarbeitet (Programm LINREG im Anhang):

m	=	18
n	=	180
$\overline{lgx}$	=	0,5909
$\overline{y}$	=	921,8025
b_{ylgx}		483,8972
a	=	635,8869
s^2_{lgx}	=	0,4063
s^2_y	=	97268,0927
s_{lgxy}	=	196,6045
SQ	=	381579,7140
SQ_1	=	23227,9100
SQ_2	=	358351,8770
$s^2_{y \cdot lgx}$	=	2143,7063

Die Gleichung der Regressionsgeraden von y (Hemmhofdurchmesser-Quadrat) bezüglich lgx (logarithmierte Konzentrationen der Eichproben) lautet:

$$y = 921,8025 + 483,8972(lgx - 0,5909)$$

Das Konfidenzintervall für den Regressionskoeffizienten β ist mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 178 Freiheitsgraden geschätzt worden und lautet:

$$473,2017 \leq \beta \leq 494,5928$$

Das Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt α ist mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 178 Freiheits-

graden geschätzt worden und lautet:

$$629{,}5673 \leq \alpha \leq 642{,}2065$$

Die Konfidenzbereiche für die Regressionsgerade Y sind mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 178 Freiheitsgraden geschätzt worden. Die ermittelten Daten für gegebene x werden in Tabelle 6 genannt.

x	y	(y-1)	(y+1)
0,25	344,5517	330,0946	359,0089
1	635,8869	626,6048	645,1689
2	781,5545	774,0826	789,0263
3,8985	921,8206	915,0221	928,6191
4	927,2221	920,4225	934,0216
6	1012,4321	1005,3447	1019,5196
8	1072,8896	1065,3152	1080,4640
10	1119,7841	1111,6990	1127,8692
16	1218,5572	1209,1104	1228,0040
20	1265,4517	1255,2579	1275,6455
30	1350,6618	1338,9968	1362,3267
40	1411,1193	1398,3447	1423,8939

Tab. 6: Konfidenzbereiche für die Regressionskurve Y bei Verwendung der quadrierten Hemmhofdurchmesserwerte

Mit Hilfe des Testes auf lineare Regression wird überprüft, ob diese Regression linear ist. Der Prüfquotient lautet:

$$v = 0{,}6563$$

Für α = 0,05 ist das 0,95-Quantil der $F_{(16,162)}$-Verteilung $f_{0,95} = 1{,}73$. Damit kann die Nullhypothese, daß die Regression von Y bezüglich X = lgx linear ist, beibehalten werden.

Aufgrund der besseren Anpassung der Stichprobenwerte bei Verwendung des Hemmhofdurchmesser-Quadrates an die neu errechnete Eichgerade ist zu empfehlen, die Konzentrationen von Untersuchungsproben unter diesen Voraussetzungen zu ermitteln, da hierdurch die Konzentrationsbestimmung genauer ausfällt.

5.3 Ergebnisse zu 4.2.1 (Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration des Lösungsmittels auf die Größe der Hemmhoffläche)

Aus Tabelle 7 geht hervor, wie sich die pH-Werte der tiefgefrorenen zu den gekühlten Proben innerhalb des Versuchszeitraumes von einem Jahr verhalten:

Zeitpunkt der pH-Messung	pH-Wert der gekühlten Proben	pH-Wert der tiefgefrorenen Proben
Tag der Herstellung	8,59	-
15 Tage später	8,66	8,55
30 Tage später	8,79	8,42
60 Tage später	8,92	8,44
90 Tage später	9,11	8,41
1/2 Jahr später	Proben kontaminiert mit	8,45
1 Jahr später	Pseudomonas fluorescens	8,43

Tab. 7: Vergleich der pH-Werte zwischen gekühlten und tiefgefrorenen Gentamicin-Serumproben im Vergleichszeitraum von einem Jahr

Während der pH-Wert der tiefgefrorenen Proben zunächst sogar noch sinkt und dann über die Versuchszeit von einem Jahr nahezu konstant bleibt, steigt der pH-Wert der gekühlten Proben kontinuierlich an.

In Tabelle 8 werden die mit einem gekühlt stehenden Standard ermittelten Konzentrationswerte einer gekühlt gelagerten (4° C) und einer tiefgefrorenen (-20° C) Kontrollprobe aufgelistet. Zum jeweiligen Konzentrationswert wird der entsprechende Hemmhofdurchmesser angegeben. Der Versuch ist am 15. Tag nach der Probenherstellung durchgeführt worden.

Lochplatte	ermittelte Konz. der gekühlten Probe	Hemmhofdurchm.	ermittelte Konz. der tiefgefrorenen Probe	Hemmhofdurchmesser
1	7,86	32,289	8,02	32,356
2	7,89	31,121	8,12	31,244
3	7,88	31,711	7,96	31,821
4	8,05	32,413	7,80	32,263
5	8,35	32,525	8,20	32,385
6	8,02	31,217	7,74	31,074
7	7,65	31,562	7,71	31,640
8	8,30	32,373	8,22	32,278
$\bar{x}$	8,00	31,901	7,97	31,883
s	0,23	0,567	0,20	0,521

Tab. 8: Bestimmung der Konzentration sowohl einer gekühlten (4° C) als auch einer tiefgefrorenen (-20° C) Kontrollprobe mit einem gekühlt stehenden Gentamicinstandard (pH-Wert des Serums 8,66) mit Angabe der den jeweiligen Konzentrationen entsprechenden Hemmhofdurchmessern

In Tabelle 9 werden die Meßdaten aufgeführt, die am 15. Tag nach der Probenherstellung mit einem tiefgefrorenen Gentamicinstandard ermittelt worden sind.

Loch-platte	ermittelte Konz. der gekühlten Probe	Hemmhof-durchm. (mm)	ermittelte Konz. der tiefgefrore-nen Probe	Hemmhof-durchmesser (mm)
1	8,32	32,482	8,26	32,404
2	8,07	31,612	7,97	31,519
3	8,11	32,518	8,04	32,455
4	7,69	31,333	7,75	31,384
5	7,86	31,963	7,80	31,911
6	8,02	32,031	8,12	32,118
7	7,77	32,312	7,80	32,325
8	7,95	31,629	8,10	31,753
$\bar{x}$	7,97	31,985	7,98	31,984
s	0,20	0,436	0,18	0,408

Tab. 9: Konzentrationsbestimmung (in mg/l) sowohl einer gekühlten (4° C) als auch einer tiefgefrorenen (-20° C) Kontrollprobe mit einem tiefgefrorenen (-20° C) Gentamicinstandard am 15. Tag nach der Probenherstellung

In den Tabellen 10 und 11 werden jeweils die Konzentrationen einer gekühlten und einer tiefgefrorenen Kontrollprobe gegenübergestellt, die einmal mit einem gekühlt stehenden Gentamicinstandard (Tabelle 10) und einmal mit einem tiefgefrorenen (-20° C) Standard (Tabelle 11) am 90. Tag nach der Gentamicinprobenherstellung bestimmt worden sind. Zu jedem ermittelten Konzentrationswert (mg/l) wird der entsprechende Hemmhofdurchmesser (mm) angegeben.

Loch-platte	ermittelte Konz. der gekühlten Probe	Hemmhof-durchm. (mm)	ermittelte Konz. der tiefgefrore-nen Probe	Hemmhof-durchm. (mm)
1	8,13	33,001	7,86	32,740
2	8,03	32,807	8,04	32,818
3	7,64	32,412	8,12	32,873
4	7,96	32,779	7,82	32,722
5	7,74	31,547	7,68	31,494
6	8,48	32,984	8,33	32,845
7	7,82	31,722	8,01	31,886
8	7,76	31,614	7,88	31,728
$\bar{x}$	7,95	32,358	7,97	32,388
s	0,27	0,633	0,20	0,580

Tab. 10: Konzentrationswerte (mg/l) und entsprechende Hemmhofdurchmesser (mm), ermittelt mit einem gekühlt stehenden (4° C) Gentamicinstandard am 90. Tag nach der Gentamicinprobenherstellung

Loch-platte	ermittelte Konz. der gekühlten Probe	Hemmhof-durchm. (mm)	ermittelte Konz. der tiefgefrore-nen Probe	Hemmhof-durchm. (mm)
1	8,23	32,992	8,27	33,048
2	7,78	32,375	7,88	32,419
3	8,13	32,818	8,25	32,922
4	7,47	31,818	7,56	31,909
5	7,91	32,655	7,98	32,721
6	8,34	33,092	8,21	32,902
7	8,25	32,866	8,11	32,733
8	7,87	32,228	7,82	32,190
$\bar{x}$	8,00	32,606	8,01	32,606
s	0,29	0,434	0,25	0,397

Tab. 11: Konzentrationswerte (mg/l) und entsprechende Hemmhofdurchmesser (mm), ermittelt mit einem tiefgefrorenen (-20° C) Gentamicinstandard am 90. Tag nach der Probenherstellung

Die in den Tabellen 8, 9, 10 und 11 aufgeführten Daten werden mit Hilfe des Differenzen-t-Testes (16) auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefaßt.

Vergleich der Konzentrationswerte der Gentamicinproben	aus Tab. 8	aus Tab. 9	aus Tab. 10	aus Tab. 11
Prüfgröße t	0,4288	0,1929	0,2677	0,3376
t(95)	2,37	2,37	2,37	2,37
(n-1) FG	7	7	7	7

Tab. 12: Statistische Auswertung der in den Tabellen 8, 9, 10 und 11 aufgeführten Konzentrationswerte der gekühlten (4° C) und tiefgefrorenen (-20° C) Gentamicinproben mit Hilfe des Differenzen-t Testes (16)

Vergleich der Hemmhofdiameterwerte	aus Tab. 8	aus Tab. 9	aus Tab. 10	aus Tab. 11
Prüfgröße t	0,4298	0,0474	0,3857	0
t(95)	2,37	2,37	2,37	2,37
(n-1) FG	7	7	7	7

Tab. 13: Statistische Auswertung der in den Tabellen 8, 9, 10 und 11 aufgeführten Hemmhofdurchmesser der gekühlten (4° C) und tiefgefrorenen (-20° C) Gentamicinproben mit Hilfe des Differenzen-t-Testes (16)

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Tabellen 12 und 13: Es bestehen weder zwischen den verglichenen Konzentrationswerten der gekühlt gelagerten und tiefgefrorenen Gentamicinproben noch zwischen den miteinander verglichenen Hemmhofdurchmesserwerten dieser Proben statistisch signifikante Unterschiede. Geringe pH-Wert-Unterschiede der Lösungsmittel, wie sie bei unterschiedlicher, langfristiger Lagerung auftreten können, haben also keinen meßbaren Einfluß auf die Gentamicinaktivität.

5.4 Ergebnisse zu 4.2.2 (zum Einfluß ikterischen Serums auf die Aktivität des Gentamicins)

Zur Untersuchung des Einflusses erhöhter Bilirubinkonzentrationen auf die Gentamicinaktivität wird zunächst jeweils eine Kontrollprobe mit einer niedrigen und einer höheren Gentamicinkonzentration in normalem (Bilirubinkonzentration ca. 8 mg/l) und in ikterischem Poolserum (Bilirubinkonzentration ca. 140 mg/l) hergestellt. Diese Kontrollproben werden dann jeweils gegen Gentamicinstandards, hergestellt aus normalem und ikterischem Poolserum, gemessen.

Die Meßdaten (Mittelwerte der in horizontaler und vertikaler Richtung ausgemessenen Hemmhofdurchmesser) der sechs Versuchsansätze (ein Ansatz entspricht einer Lochplatte) sind in den Tabellen 14 und 15 aufgelistet. Die Kontrollproben aus normalem Poolserum sind mit 1a und 2a, die aus ikterischem Serum mit 1b und 2b bezeichnet.

In der ersten Vergleichsuntersuchung werden die Konzentrationen der Kontrollproben 1a, 1b, 2a und 2b mit dem Gentamicinstandard aus normalem Poolserum bestimmt (Tabelle 16). Die zweite Vergleichsuntersuchung wird mit dem Gentamicinstandard aus ikterischem Poolserum durchgeführt (Tabelle 17).

Zu den Eichkurven aus der ersten und zweiten Vergleichsuntersuchung werden jeweils die Regressionsanalysen durchgeführt (Programm LINREG und TEST LIN im Anhang).

Mit Hilfe des Differenzen-t-Testes (16) wird überprüft, ob die Mittelwerte der Konzentrationen aus 1a und 1b sowie aus 2a und 2b statistisch signifikant voneinander abweichen (Tabellen 18 und 19).

Im Parallelitätstest (Programm PAR und TEST im Anhang) wird abschließend die Gleichheit der beiden Regressionsgeraden geprüft. Er informiert zusätzlich (zum Differenzen-t-Test) darüber, ob hohe Bilirubinkonzentrationen im Serum einen Einfluß auf die Gentamicinaktivität haben.

Konz. (mg/l)	Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser (mm) Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6
20	35,127	35,142	34,866	34,950	35,317	35,272
10	33,322	33,344	33,557	33,368	32,682	33,250
5	30,665	30,686	30,943	30,988	30,761	31,192
2,5	28,272	28,585	28,553	27,669	28,112	28,531
1,25	25,751	25,839	25,170	25,922	25,983	25,551
0,625	22,670	22,332	22,630	22,783	21,344	21,948
Probe 1a	33,044	33,090	33,304	33,111	33,271	33,240
Probe 1b	33,406	33,301	33,255	33,448	33,247	33,588
Probe 2a	28,615	28,083	28,795	28,785	28,576	28,709
Probe 2b	28,206	28,320	28,206	28,651	28,577	28,808

Tab. 14: Hemmhofdurchmesser der Eich- und Kontrollproben (Gentamicinstandard aus normalem Poolserum)

Konz. (mg/l)	Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser (mm) Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6
20	34,934	34,799	34,999	35,420	35,200	35,242
10	32,756	32,757	33,126	33,139	33,531	33,822
5	31,031	31,223	31,006	30,921	30,785	31,116
2,5	28,481	28,501	28,594	28,453	28,366	28,849
1,25	25,918	25,932	25,528	25,810	26,012	26,171
0,625	22,892	22,607	22,782	22,929	22,915	22,844

Tab. 15: Hemmhofdurchmesser der Eichproben, die aus ikterischem Poolserum hergestellt worden sind

Regressionsrechnung zur Eichkurve aus dem ersten Vergleich (Gentamicinstandard aus normalem Serum)

m	=	6
n	=	36
$\overline{lgx}$	=	0,5485
$\overline{y}$	=	874,9590
$b_{y \cdot lgx}$	=	490,5732
a	=	605,9017

Die Gleichung der Regressionskurve von y (Hemmhofdurchmesser-Quadrat) bezüglich lgx (logarithmierte Konzentration der Eichprobe) lautet:

$$y = 874,9590 + 490,5732(lgx - 0,5485)$$

Das Konfidenzintervall für den Regressionskoeffizienten β (Programm KONF b im Anhang) wird mit dem (1-0,05/2)-Quantil der t-Verteilung mit (n-2) = 34 Freiheitsgraden geschätzt und lautet:

$$478,2185 \leq \beta \leq 502,9279$$

Entsprechend den obigen Angaben zur t-Verteilung lautet das Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt α (Programm KONF a im Anhang):

$$612,6776 \geq \alpha \geq 599,1257$$

Die Regression Y bezüglich X = lgx wird auf Linearität überprüft (Programm LINREG und TEST LIN im Anhang). Der Prüfquotient lautet:

$$v = 1,7093$$

Das 0,95-Quantil der $F_{4,30}$-Verteilung $f_{0,95}$ ist 2,69. Die Nullhypothese H_0 wird daher nicht abgelehnt.

Regressionsrechnung zur Eichkurve aus dem zweiten Vergleich (Gentamicinstandard aus ikterischem Poolserum)

m	=	6
n	=	36
$\overline{lgx}$	=	0,5485
$\overline{y}$	=	883,6342
$b_{y \cdot lgx}$	=	474,0473
a	=	623,6406

Die Gleichung der Regressionskurve von y (Hemmhofdurchmesser-Quadrat) bezüglich lgx lautet:

$$y = 883,6342 + 474,0473(lgx - 0,5485)$$

Das Konfidenzintervall für den Regressionskoeffizienten β lautet:

$$463,9146 \leq \beta \leq 484,1800$$

Das Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt α lautet:

$$629,1980 \geq \alpha \geq 618,0833$$

Die Regression Y bezüglich X = lgx wird auf Linearität überprüft. Der Prüfquotient lautet: v = 1,1202.

Das 0,95-Quantil der $F_{4,30}$-Verteilung $f_{0,95}$ ist 2,69. H_0 wird daher nicht abgelehnt. Die Regression kann als linear angesehen werden.

Die Tabelle 16 enthält die Konzentrationswerte (mg/l) der Kontrollproben 1a, 1b sowie 2a und 2b, die mit dem Gentamicinstandard aus normalem Poolserum bestimmt worden sind, Tabelle 17 die Meßdaten, die mit dem ikterischen Standard ermittelt wurden (Programm LINREG und KONZ im Anhang).

Ansatz Nr.	Kontroll-probe 1a	Kontroll-probe 1b	Kontroll-probe 2a	Kontroll-probe 2b
1	9,7878	10,9577	2,7165	2,4358
2	9,9286	10,6034	2,3579	2,5106
3	10,6133	10,4521	2,8515	2,4358
4	9,9936	11,1031	2,8439	2,7430
5	10,5044	10,4260	2,6882	2,6890
6	10,4033	11,6031	2,7861	2,8616
$\bar{x}$	10,2052	10,8576	2,7074	2,6126

Tab. 16: Konzentrationswerte (mg/l) der vier Kontrollproben aus Vergleich 1 (Gentamicinstandard aus normalem Poolserum)

Ansatz Nr.	Kontroll-probe 1a	Kontroll-probe 1b	Kontroll-probe 2a	Kontroll-probe 2b
1	9,7235	10,9287	2,5807	2,3052
2	9,8683	10,5631	2,2290	2,3785
3	10,5734	10,4072	2,7135	2,3052
4	9,9351	11,0788	2,7060	2,6067
5	10,4611	10,3803	2,5529	2,5536
6	10,3569	11,5955	2,6491	2,7234
$\bar{x}$	10,1531	10,8256	2,5719	2,4788

Tab. 17: Konzentrationswerte (mg/l) der vier Kontrollproben aus Vergleich 2 (Gentamicinstandard aus ikterischem Poolserum)

Mit Hilfe des Differenzen-t-Testes (Programm DIFF-T im Anhang) wird überprüft, ob die Mittelwerte der Gentamicinkonzentrationen aus 1a und 1b sowie aus 2a und 2b statistisch signifikant voneinander abweichen. Tabelle 18 enthält die Vergleichsdaten der Konzentrationsmittelwerte, die aus der Bestimmung mit dem normalen Gentamicinstandard resultieren. In Tabelle 19 sind die Prüfergebnisse der Konzentrationsmittelwerte aufgeführt, die mit dem Gentamicinstandard aus ikterischem Poolserum ermittelt worden sind.

	Vergleich der Konzentrationsmittelwerte aus 1a u. 1b	Vergleich der Konzentrationsmittelwerte aus 2a u. 2b
Prüfgröße t	2,5440	1,0657
t(95)	2,015 (einseitig)	2,015 (einseitig)
	2,571 (zweiseitig)	2,571 (zweiseitig)
(n-1) FG	5	5

Tab. 18: Vergleich der Konzentrationsmittelwerte der vier Kontrollproben mit Hilfe des Differenzen-t-Test (Gentamicinstandard aus normalem Poolserum)

	Vergleich der Konzentrationsmittelwerte aus 1a u. 1b	Vergleich der Konzentrationsmittelwerte aus 2a u. 2b
Prüfgröße t	2,5434	1,0671
t(95)	2,015 (einseitig)	2,015 (einseitig)
	2,571 (zweiseitig)	2,571 (zweiseitig)
(n-1) FG	5	5

Tab. 19: Prüfdaten aus dem Differenzen-t-Test im zweiten Vergleich (ikterischer Gentamicinstandard)

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Tabellen 18 und 19

Zu Tabelle 18: Die Konzentrationsmittelwerte aus 1a und 1b unterscheiden sich im einseitigen Differenzen-t-Test statistisch signifikant. Nach dem zweiseitigen Test besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. Wird seine Strenge als ausreichend betrachtet, so übt das Bilirubin keinen Einfluß aus im Sinne einer Aktivitätsminderung des Gentamicin.

Die Konzentrationsmittelwerte aus 2a und 2b unterscheiden sich statistisch nicht voneinander.

Zu Tabelle 19: Die Ergebnisse aus dem ersten Vergleich werden hier reproduziert. Der Unterschied der Konzentrationsmittelwerte aus 1a und 1b erweist sich im einseitigen Differenzen-t-Test als statistisch signifikant. Im zweiseitigen Test besteht dieser Unterschied nicht mehr.

Die Konzentrationsmittelwerte aus 2a und 2b unterscheiden sich in diesem zweiten Vergleich ebenfalls statistisch nicht voneinander.

Ein Einfluß des Bilirubins auf die Aktivität des Gentamicin kann nach diesen Ergebnissen nicht völlig ausgeschlossen werden. Sollte er tatsächlich bestehen, so dürfte er allerdings sehr klein sein und deshalb bei der therapiebegleitenden Spiegelkontrolle keine Rolle spielen.

Um dieses Ergebnis weiter abzusichern, wird im Parallelitätstest (Programm PAR und TEST im Anhang) die Gleichheit der beiden Regressionsgeraden geprüft. Der Prüfquotient lautet:

$$t = 2{,}1099$$

Die Signifikanzschranke ist mit $(n_1 + n_2 - 4) = 8$ Freiheits-

graden im einseitigen Test, t-verteilt und α = 0,05

$$t = 1{,}860$$

Damit verläuft die Gerade $Y_{\text{Serum normal}}$ statistisch signifikant unparallel zur Geraden $Y_{\text{ikt. Serum}}$.
Die Signifikanzschranke für den zweiseitigen t-Test ist für 8 Freiheitsgrade und α = 0,05

$$t = 2{,}306$$

Hiernach wird die Nullhypothese H_0, die Geraden verlaufen einander parallel, nicht abgelehnt. Die Urteilsstrenge des zweiseitigen t-Testes darf als ausreichend für diesen Versuch gelten.

5.5 Ergebnisse zu 4.2.3 (zu den Meßfehlern bei der Herstellung von Eichprobenlösungen: Volumenfehler der Pipetten)

Die mit den ausgewählten Vollpipetten gemessenen Volumina destillierten Wassers werden durch Auswiegen überprüft. Die ermittelten Abweichungen werden den jeweiligen Toleranzgrenzen der Vollpipetten (entsprechen der oberen und unteren Grenze des möglichen systematischen Volumenfehlers) in der nachfolgenden Tabelle 20 gegenübergestellt. Jede Meßreihe besteht aus 10 Einzelmessungen.

Die mittleren Volumenabweichungen werden bei der Berechnung der mittleren Konzentrationsfehler, die bei der Eichprobenherstellung auftreten, berücksichtigt.

Sollvolumen der Vollpipette	angegebene Toleranzgrenzen in ml	mittleres gemessenes Volumen in ml	Differenz Sollvolumen - mittleres Vol.	mittlere Volumenabweichung in ml
1	0,007	1,00494	0,00494	0,010
2	0,010	2,01750	0,01750	0,014
6	0,015	6,00363	0,00363	0,060
10	0,015	10,01947	0,01947	0,045
50	0,035	49,86061	0,13939	0,033

Tab. 20: Gegenüberstellung von Sollvolumen und mittlerem Volumen der für die Eichprobenherstellung verwendeten ETERNA BRAND-Vollpipetten mit Angabe des mittleren Volumenfehlers (Standardabweichung)

Die mittlere Volumenabweichung ist der mittlere zufällige Fehler eines jeden Pipettier- und Wägevorganges. Er ist erwartungsgemäß größer als der vom Pipettenhersteller angegebene systematische Volumenfehler (Toleranzgrenzen) der Pipetten. Eine Zerlegung der mittleren Volumenabweichung in mittleren zufälligen Fehler und systematischen Fehler entfällt hier, da für jeden Wägevorgang einer Meßreihe eine andere Pipette derselben Volumengröße eingesetzt wird. Dadurch wird der systematische Volumenfehler in einen zufälligen Fehler transformiert.

5.6 Ergebnisse zu 4.3.1 (Verfahren zur Ermittlung der Meßfehler bei der Herstellung der Gentamicin-Eichproben)

Entsprechend den Angaben in 4.3.1 zur Schätzung eines mittleren fortgepflanzten Fehlers wird jeder fiktiven Eichprobenkonzentration der nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz geschätzte mittlere Fehler zugeordnet (Tabelle 21).

fiktive Eichprobenkonzentration (mg/l)	mittlerer fortgepfl. Fehler	fiktive Eichprobenkonzentration (mg/l)	mittlerer fortgepfl. Fehler
40	0,31	4	0,04
32	0,29	3	0,03
20	0,15	2,5	0,02
16	0,14	2	0,02
12	0,13	1,25	0,01
10	0,08	1	0,01
8	0,07	0,625	0,005
6	0,07	0,3125	0,003
5	0,04	0,25	0,002

Tab. 21: mittlere fortgepflanzte Fehler bei den fiktiven Gentamicin-Eichprobenkonzentrationen (siehe Anhang II)

5.7 Ergebnisse zu 4.4 (Statistische Qualitätskontrolle)

In Tabelle 22 sind die Konzentrationswerte der Gentamicinserumproben Nr. 1 und Nr. 2 wiedergegeben, die von den vier voneinander unabhängig arbeitenden Untersuchern A, B, C und D an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (pro Tag eine Serie) ermittelt worden sind.

Mit Hilfe von Entscheidungs-Tests (F-Test: Vergleich von Varianzen und t-Test: Vergleich von Mittelwerten) wird überprüft, ob die Ergebnisse der vier Untersucher nur zufallsmäßigen, statistisch nicht signifikanten Schwankungen unterliegen. Sollte dies der Fall sein, können die Konzentrationswerte zu je einem gemeinsamen Sollprobenwert Nr. 1 und Nr. 2 zusammengefaßt werden.

	Untersucher A		Untersucher B	
	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
	4,81	15,54	4,50	15,89
	4,34	15,10	4,34	15,33
	4,14	16,09	4,68	16,76
	5,04	15,28	4,13	15,44
	4,29	17,18	4,85	16,54
$\bar{x}$	4,524	15,838	4,50	15,992
s	0,382	0,838	0,282	0,641
$s_{\%}$	8,45	5,3	6,26	4,0

	Untersucher C		Untersucher D	
	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
	6,23	17,09	4,29	16,38
	5,88	17,67	4,71	16,41
	5,28	18,98	4,89	15,33
	5,53	18,69	4,45	15,08
	5,91	18,75	4,38	16,01
$\bar{x}$	5,766	18,236	4,544	15,842
s	0,368	0,815	0,249	0,609
$s_{\%}$	6,4	4,5	5,48	3,84

Tab. 22: gruppierte Gentamicinkonzentrationswerte der Proben Nr. 1 und Nr. 2, ermittelt von den Untersuchern A, B, C und D

Für die Konzentrationsbestimmung benutzten die Untersucher die Rechnerprogramme LINREG und KONZ (siehe aufgelistete Programme im Anhang).

In den nachfolgenden Tabellen 23 und 24 werden mit Hilfe des F-Testes (16) die Varianzen der in vier Gruppen zusammengefaßten Konzentrationswerte der Proben Nr. 1 und Nr. 2 miteinander verglichen, um zu entscheiden, ob die vier Standardabweichungen zu einer gemeinsamen Vergleichsstandardabweichung zusammengefaßt werden dürfen.

		Varianz B	Varianz C	Varianz D
Varianz A	PF	1,84	1,07	2,35
	F(95)	6,39	6,39	6,39
Varianz B	PF			1,28
	F(95)			6,39
Varianz C	PF	1,92		2,21
	F(95)	6,39		6,39

Tab. 23: Vergleich der Varianzen der gruppierten Konzentrationswerte der Probe Nr. 1

		Varianz B	Varianz C	Varianz D
Varianz A	PF	1,72	1,05	1,90
	F(95)	6,39	6,39	6,39
Varianz B	PF			1,10
	F(95)			6,39
Varianz C	PF	1,64		1,81
	F(95)	6,39		6,39

Tab. 24: Vergleich der Varianzen der gruppierten Konzentrationswerte der Probe Nr. 2

Zusammenfassung der Resultate aus dem durchgeführten F-Test

Da die Prüffaktoren (PF) in allen Fällen stets kleiner sind als die Signifikanzschranken F(95), ist ein Unterschied zwischen den Standardabweichungen s_A, s_B, s_C und s_D statistisch nicht feststellbar. Die Konzentrationsmessungen sind von allen vier Untersuchern mit gleicher Präzision durchgeführt worden. Eine Zusammenfassung von s_A, s_B, s_C und s_D zu einer gemeinsamen Vergleichsstandardabweichung s_g ist daher statthaft. Dieses s_g ist jedoch nur dann von Interesse, wenn auch die Mittelwerte x_A, x_B, x_C und x_D und damit natürlich alle Einzelwerte zu einem gemeinsamen Mittelwert x_g zusammengefaßt werden dürfen. Die Bildung eines gemeinsamen Mittelwertes x_g setzt voraus, daß sich die Mittelwerte x_A, x_B, x_C und x_D voneinander statistisch nicht unterscheiden.

Für den Vergleich von Mittelwerten bietet sich der t-Test an. Die Ergebnisse aus diesem Test sind in den Tabellen 25 und 26 zusammengestellt.

		x_B	x_C	x_D
x_A	Tau	0,113	5,237	0,098
	t(95)	2,31	2,31	2,31
x_B	Tau		6,111	0,262
	t(95)		2,31	2,31
x_C	Tau			6,15
	t(95)			2,31

Tab. 25: Vergleich der Konzentrationsmittelwerte der Probe Nr. 1 im t-Test

		x_B	x_C	x_D
x_A	Tau	0,326	4,59	0,086
	t(95)	2,31	2,31	2,31
x_B	Tau		4,839	0,379
	t(95)		2,31	2,31
x_C	Tau			5,261
	t(95)			2,31

Tab. 26: Vergleich der Konzentrationsmittelwerte der Probe Nr. 2 im t-Test

Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem durchgeführten t-Test zum Vergleich von Mittelwerten

Die Mittelwerte x_A, x_B und x_D unterscheiden sich statistisch voneinander nicht. Die Prüfgröße Tau für diese Werte ist stets kleiner als die Signifikanzschranke t(95). Dagegen unterscheidet sich der Mittelwert x_C von den übrigen Mittelwerten signifikant. Es können daher nur die Mittelwerte x_A, x_B und x_D zu einem gemeinsamen Mittelwert x_g zusammengefaßt werden. Dieser gemeinsame Mittelwert stellt den Sollwert für die jeweilige Sollprobe dar. Zu diesem gemeinsamen Mittelwert wird dann die gemeinsame Vergleichsstandardabweichung s_g berechnet.

Dementsprechend ergeben sich aus den Einzelmessungen der Untersucher A, B und D (Tabelle 22) folgende Kenndaten:

a) gemeinsamer Mittelwert x_{g_1} =
Sollwert der Sollprobe Nr. 1 4,522 mg/l

Vergleichsstandardabweichung s_{g_1} 0,287 mg/l

untere Kontrollgrenze für die Richtigkeit im eigenen Labor (statistische Qualitätskontrolle) (Sollwert abzüglich 10 %)	4,07 mg/l
obere Kontrollgrenze (Sollwert zuzüglich 10 %)	4,97 mg/l
untere Kontrollgrenze für die Richtigkeitskontrolle im Ringversuch (Sollwert abzüglich 3fache Vergleichsstandardabweichung)	3,66 mg/l
obere Kontrollgrenze (Sollwert zuzüglich 3fache Vergleichsstandardabweichung)	5,38 mg/l

b) gemeinsamer Mittelwert x_{g_2} = Sollwert der Sollprobe Nr. 2 — 15,891 mg/l

Vergleichsstandardabweichung s_{g_2}	0,655 mg/l
untere Kontrollgrenze für die Richtigkeit im eigenen Labor	14,30 mg/l
obere Kontrollgrenze	17,48 mg/l
untere Kontrollgrenze für die Richtigkeit im Ringversuch	13,93 mg/l
obere Kontrollgrenze	17,86 mg/l

Die Berechnung der Kontrollgrenzen entspricht den Forderungen der "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde" (27).

In einer Vorserie werden nun die Sollproben zur Oberprüfung der Richtigkeit der Analysen im eigenen Labor (statistische Qualitätskontrolle) zusammen mit einer Präzisionskontrollprobe an 20 verschiedenen Tagen eingesetzt. In Tabelle 27 sind die Gentamicinkonzentrationswerte der drei analysierten Proben aufgelistet.

Serie	Präzisions-kontrollprobe	Sollprobe Nr. 1	Sollprobe Nr. 2
1	7,88	4,50	15,84
2	7,99	4,47	16,70
3	8,01	4,38	15,97
4	7,84	4,33	15,87
5	8,03	4,53	16,54
6	8,21	4,42	15,70
7	8,09	4,43	16,49
8	7,82	4,33	16,28
9	7,97	4,44	15,67
10	7,71	4,34	15,51
11	7,79	4,46	15,73
12	7,61	4,59	15,92
13	7,57	4,56	15,97
14	7,79	4,05	16,48
15	7,77	4,50	16,29
16	8,45	4,86	15,90
17	8,04	4,93	17,00
18	8,38	4,70	15,99
19	8,23	4,70	16,33
20	8,17	4,71	15,98
$\bar{x}$	7,968	4,512	16,108
s	0,240	0,201	0,388

Tab. 27: Meßwerte der Gentamicinkonzentrationen (mg/l) einer Präzisionskontrollprobe sowie der Soll-

Eine Analyse der Sollproben an mindestens 20 verschiedenen Tagen in einer Vorserie, wie sie für Präzisionskontrollproben vorgeschrieben ist, wird in (27) allerdings nicht verlangt. Um aber eventuell vorhandene systematische Fehler bei der Konzentrationsbestimmung mit der ADM im eigenen Labor rechtzeitig aufzudecken, empfiehlt es sich, die Richtigkeitskontrollproben schon in einer Vorserie mitzuführen.

Die in Tabelle 27 angegebenen Mittelwerte 4,512 mg/l und 16,108 mg/l werden nun mit den Sollwerten Nr. 1 (4,522 mg/l) und Nr. 2 (15,891 mg/l) verglichen, um die Richtigkeit der Gentamicinkonzentrationsbestimmung zu überprüfen. Dazu eignet sich ein modifizierter t-Test (Vergleich von Mittelwert und Sollwert) (16), in dem die Prüfgröße TAU wie folgt ermittelt wird:

$$TAU = \frac{\bar{x} - SW}{s} \cdot radix(n)$$

Dieser Test führt zu den folgenden Ergebnissen:

Sollprobe Nr.1		Sollprobe Nr. 2	
n_1	= 20	n_2	= 20
x_1	= 4,512 mg/l	x_2	= 16,108 mg/l
s_1	= 0,201 mg/l	s_2	= 0,388 mg/l
SW_1	= 4,522 mg/l	SW_2	= 15,891 mg/l
TAU	= 0,2336	TAU	= 2,501

Tab. 28: Vergleich von Mittelwerten und Sollwerten in einem modifizierten t-Test zur Oberprüfung der Richtigkeit im eigenen Labor

Für f = (n - 1) = 19 Freiheitsgrade folgt aus der t-Tabelle:

t(95) = 2,09 und t(99) = 2,86

Zusammenfassung der Ergebnisse der Richtigkeits- und Präzisionskontrolle in der Vorserie

Zwischen dem Mittelwert x_1 und dem Sollprobenwert Nr. 1 (SW_1) besteht statistisch kein signifikanter Unterschied, da die Prüfgröße TAU mit 0,2336 deutlich kleiner ausfällt als die Signifikanzschranke t(95).

Hingegen besteht zwischen dem Mittelwert x_2 und dem Sollprobenwert Nr. 2 (SW_2) wahrscheinlich ein Unterschied, da die Prüfgröße TAU mit 2,501 größer ist als die Signifikanzschranke t(95), aber kleiner als t(99). Um dieses Ergebnis abzusichern, wären weitere Konzentrationsmessungen durchzuführen. Da jedoch der Mittelwert x_2 sowie sämtliche Einzelwerte der Sollprobenanalyse in der Vorserie innerhalb der 10%- und 3s-Kontrollgrenzen des Sollprobenwertes Nr. 2 liegen, wird auf weitere Analysen verzichtet. Signifikante Unterschiede in den Konzentrationsmessungen, die auf das Vorliegen eines systematischen Fehlers schließen lassen, bestehen also nicht.

Die ermittelten Konzentrationswerte der Präzisionskontrollprobe in der Vorserie dienen zur Festlegung einer unteren und oberen Warngrenze (2fache Standardabweichung) sowie einer unteren und oberen Kontrollgrenze (3fache Standardabweichung) für zukünftige Präzisionskontrollen bei routinemäßigen Konzentrationsbestimmungen.

Die relative Standardabweichung der hier gemessenen Konzentrationseinzelwerte mit ca. 3 % ist deutlich geringer als die zulässige Grenze von 5 % (27). Die in der Vorserie erzielte Präzision, mit der die Analysen der Proben im Lochplattentest durchgeführt worden sind, ist ausreichend. Sie genügt den Anforderungen nach (27).

6. Diskussion

6.1 Diskussion zur Durchführung der Methode

Die Durchführung der Agardiffusionsmethode (ADM) im Lochplattenverfahren wird bereits von KLEIN (17) ausführlich beschrieben. Er weist auf die Notwendigkeit hin, die einzelnen Versuchsabläufe und die hierbei verwendeten Materialien zu standardisieren, damit quantitative Antibiotikabestimmungen zuverlässig durchführbar sind. Sämtliche Maßnahmen zur Erzielung einer optimalen Standardisierung orientieren sich hierbei an der Forderung, daß innerhalb der gleichen Versuchsreihe Proben mit gleicher Antibiotikumkonzentration gleichgroße Hemmhöfe verursachen müssen. Dennoch auftretende Variationen müssen als vorwiegend zufallsbedingte Abweichungen von einem wahren, aber unbekannten Wert zu erklären sein.

Als wichtigste Größen, die unbedingt der Standardisierung bedürfen, nennt KLEIN die Schichtdicke des Agars, die Testkeimsuspension sowie die Stanzlochgröße und das Flüssigkeitsvolumen der Eich- und Untersuchungsproben.

Neben der Normierung der Schichtdicke ist darauf zu achten, daß die Agarschicht über der gesamten Bodenfläche gleichmäßig dick ist. Die folgenden Ursachen, die zur Entstehung einer ungleichmäßig dicken Nährbodenschicht führen, können durch eigene Beobachtung bestätigt werden:

a) Verwendung von Küvetten mit horizontal schiefer Bodenplatte (Das ist bei den routinemäßig verwendeten einfachen Petrischalen stets der Fall.),
b) nicht genau in der waagerechten Ebene liegende Gießtischplatte und
c) Verwendung eines sehr niedrig temperierten Nährmediums (unter 50° C), das sich nach dem Eingießen in die Küvette wegen seiner Zähflüssigkeit nicht mehr gleichmäßig verteilt.

Auf diese große Fehler bei der Konzentrationsbestimmung verursachenden Faktoren weist de LOUVOIS (21) in einer neueren Arbeit nochmals hin. Übereinstimmend mit KLEINs und de LOUVOIS' Empfehlungen wird der Entstehung ungleichmäßig dikker Agarschichten durch folgende Maßnahmen entgegengewirkt:

a) Die Gießtemperatur wird konstant bei 60° C gehalten.
b) Die Gießtischplatte wird täglich vor dem Ansatz in der waagerechten Ebene austariert.
c) Die Bodenplatte der Glasküvette wird ebenfalls auf die horizontale Lage hin mit einer geeichten Libelle überprüft.

Für die eigenen Versuche ist für jede Serie eine andere Glasküvette benutzt worden, so daß verbleibende minimale Unebenheiten durch den Küvettenwechsel von Tag zu Tag lediglich als Zufallsabweichungen das Ergebnis einer Bestimmung beeinträchtigen. So werden auch diese verbleibenden, ursprünglich systematischen Fehler durch die Verwendung stets verschiedener Küvetten in zufällige Fehler transformiert. Die eigenen Untersuchungen führen ferner zu der Beobachtung, daß Agarplatten, die länger als 24 Stunden im Kühlschrank bei 4° C lagern, zuviel Flüssigkeit entzogen wird. Somit wird indirekt die Einsaatdichte erhöht. Die Nährbodenschicht wird flacher und bekommt feine Risse, in die die einpipettierte Antibiotikumlösung bevorzugt abdiffundiert. Hierdurch wird u. a. die Entstehung unsymmetrischer Hemmhöfe begünstigt. Daraus folgt die Empfehlung, nur Agarplatten einzusetzen, die nicht länger als 24 Stunden im Kühlschrank bei 4° C standen.

Der pH-Wert des Nährbodens soll dem entsprechen, bei dem das zu untersuchende Antibiotikum sein Wirkungsoptimum hat. Das Wirkungsoptimum von Gentamicin liegt im alkalischen Bereich bei einem pH-Wert von 7,8 (23). Mit ansteigenden pH-

Werten im Lösungsmittel Serum wäre daher auch eine Änderung der Hemmhofgröße zu erwarten gewesen. Dagegen zeigen die eigenen Untersuchungen, daß der pH-Wert des Lösungsmittels von Gentamicin ohne Einfluß auf die Hemmhofgröße ist. Die Hemmhofdiameter von Serumproben gleicher Konzentration, aber verschiedener pH-Werte weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Diese Beobachtung machen bereits ABRAHAM et al. am Penicillin (1). Die Ursache für die Wasserstoffionentoleranz liegt offenbar einerseits in der Pufferfähigkeit des Nährmediums und andererseits in der sehr geringen inokulierten Antibiotikumlösung (0,1 ml). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Forderung von KLEIN (17), daß das pH von Testflüssigkeit, Eichprobenlösung und Nährboden genau übereinstimmen soll. Diese Forderung wird von ihm allerdings nicht begründet.

Entsprechend beobachtet DEACON (11) eine Zunahme der absoluten Hemmhofgröße bei den untersuchten Gentamicinkonzentrationen (2,5 bis 40 mg/l), wenn sie den pH-Wert des Nährbodens von 6,5 auf 9,5 erhöht.

Je größer der Hemmhof ist, desto geringer ist der beim Ausmessen entstehende relative Fehler, solange der Hemmhofrand scharf begrenzt ist.

Außer der absoluten Hemmhofgröße sind die Intervalle der Hemmhofdurchmesser bedeutsam. Bei ihren Untersuchungen mit Gentamicin und Staphylococcus aureus sowie Klebsiella edwardii als Testkeime stellt DEACON (11) eine Zunahme der Hemmhofdurchmesserintervalle bei gleichbleibenden Eichprobenkonzentrationsintervallen (2,5 bis 40 mg/l) mit steigender Kochsalzkonzentration (0,5 bis 1,5 % NaCl) im Nährboden fest. Große Hemmhofdurchmesserintervalle gewährleisten eine genauere Konzentrationsbestimmung, insbesondere bei grafischer Auswertung mit Hilfe einer Eichkurve. Sie bestimmen die Lage der Kurve im Koordinatenkreuz und haben entscheidenden Einfluß auf den Regressionskoeffizienten. Die Intervallgrößen

sind ein direkter Parameter für die Aktivität eines Antibiotikums.

In den eigenen Untersuchungen wird statt Staphylokokken und Klebsiellen ausschließlich Bacillus subtilis als Testkeim eingesetzt. Durch diese Wahl des Testkeimes werden erhöhte Kochsalzkonzentrationen im Nährmedium unnötig. Bei der Auswahl des Testkeimes ist auf folgende Eigenschaften zu achten:

a) geringe Pathogenität,
b) hohe Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum, dessen Konzentration bestimmt werden soll,
c) Ausbildung gleichmäßiger, dichter Hemmhofränder bei optimaler Einsaatdichte,
d) schnelles Wachstum bei 37° C,
e) Lagerbeständigkeit über einen langen Zeitraum in tiefgefrorenen (-20° C) Stammsuspensionen.

KLEIN (17) empfiehlt als Testkeim aerobe Sporenbildner. Sie können wegen ihrer Hitzeresistenz dem gießfertigen Medium bei 70° C zupipettiert werden, ohne daß dabei ein Teil abgetötet wird und es so zu einer geringeren Einsaatdichte kommt, als vorgesehen ist. Ein weiterer Vorteil ist ihre lange Lagerfähigkeit in tiefgefrorenen (-20° C) Suspensionen, ohne daß die Individuendichte durch Absterben nennenswert reduziert wird. Auf diese Weise wird über Jahre hinweg eine gleichmäßige Einsaatdichte gewährleistet. Ausführliche Angaben zur Kultivierung und Lagertechnik geeigneter Sporenstämme sind den Arbeiten von KLEIN (17), KONDO (18) und de LOUVOIS (21) zu entnehmen. Die hier beschriebenen Versuche sind in einem Zeitraum von vier Jahren durchgeführt worden. Der dafür verwendete Testkeim Bacillus subtilis (ATCC 6633)

steht in einer tiefgefrorenen (-20° C), hochkonzentrierten Stammsuspension ($2{,}4 \cdot 10^7$ Keime/ml) zur Verfügung. Die Keimzahl pro Volumeneinheit hat sich im Versuchszeitraum nicht vermindert. Ein konstante Ausgangskeimzahl ist zur Erzielung gleichbleibender Einsaatdichten des Testkeimes im Testagar wichtig. Auch über die Einsaatdichte läßt sich die Hemmhofgröße steuern. Limitierend ist hier die Qualität der Hemmhofränder. Für die Gentamicin-Konzentrationsbestimmung liegt die optimale Einsaatdichte zwischen 7500 und 10000 Keime/ml Agar. Geringere Keimzahlen führen zu unscharf begrenzten, höhere zur Ausbildung zu kleiner Hemmhöfe. Kleinere Hemmhöfe, insbesondere im unteren Konzentrationsbereich ab 1 mg Gentamicin/l und niedriger, sowie größere mit unregelmäßigem Hemmhofrand führen zu ungenauen Meßergebnissen.

Trotz der genannten Vorteile von Sporensuspensionen setzen manche Autoren für ihre Untersuchungen vegetative Keime ein. SHANSON et al. (30) verwenden als Testkeim Klebsiella-Spezies. Diese Keime bewähren sich besonders beim Agardiffusionstest mit stark verkürzter Inkubationsphase zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Gentamicin und Tobramycin. Da diese Keime auf der Agaroberfläche schneller wachsen als in festen Nährmedien und zudem wesentlich hitzelabiler sind als Sporen, zogen die Autoren die Oberflächenkultur der Einsaat in den heißen, gießfertigen Nährboden vor.

Aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse sind folgende Maßnahmen besonders wichtig und dringend zu empfehlen:

1. Standardisierung der Zusammensetzung des Agars mit Festlegung des pH-Wertes,
2. Festlegung des Testkeimes und Standardisierung der Keimeinsaatdichte,
3. die Lagerzeit der gebrauchsfertigen Gußplatten sollte 24 Stunden nicht überschreiten,
4. Standardisierung der Gentamicin-Eichproben (Um systematische Massenfehler so gering wie mög-

lich zu halten, sollten die Eichproben aus drei verschiedenen Gentamicinchargen hergestellt werden. Da Gentamicin stabil ist, empfiehlt sich die portionierte Lagerung einer größeren Charge Eichproben bei -20^{o} C. Die Eichprobenbehälter müssen so beschaffen sein, daß in sie weder Flüssigkeit eindringen noch aus ihnen entweichen kann.

4. Verwendung plangeschliffener Küvetten und eines tarierbaren Gießtisches mit ebenfalls plangeschliffener Arbeitsplatte.
5. Konzentrationsbestimmungen von Untersuchungsproben immer zusammen mit Präzisionskontroll-, Richtigkeitskontroll- und Eichproben auf einer Lochplatte durchführen. Die Bestimmung nach Möglichkeit immer doppelt in zwei Serien, d. h. auf zwei Platten durchführen.

6.2 Diskussion zur Auswertung der Meßdaten und zur Konzentrationsbestimmung der Gentamicinproben

KLEIN (17) wertet seine Meßdaten grafisch aus. Die Anpassung der Eichgeraden an die Meßpunkte erfolgt hierbei nach Augenmaß. Verständlicherweise unterliegt ein solches Verfahren der Ergebnisermittlung einer individuellen Willkür, die einen nicht unbeträchtlichen personengebundenen systematischen Fehler in sich birgt. CAVALLI-SFORZA (4), DALLMANN/ELSTER (10) sowie LOCHMANN (20) geben zur nomografischen Darstellung der Meßergebnisse gute Anleitungen. Die bildliche sowie die rechnerische Darstellung der statistischen Auswer-

tung werden bei KREYSZIG (19) ausführlich abgehandelt. An die Stelle dieser teilweise heute noch üblichen grafischen Auswertung mittels Eichkurve auf Zeichenpapier mit halblogarithmischer Koordinateneinteilung (z. B. SELECTA, Nr. 373 1/2 A3) tritt zunehmend die rechnerunterstützte Konzentrationsbestimmung. Leistungsfähige Taschenrechner (z. B. HP-41C und Ti 59) sind mit ihrer hohen Programmspeicherkapazität in der Lage, mehrere Programme zur Meßdatenauswertung und statistischen Oberprüfung der Konzentrationsergebnisse zu speichern und durch sinnvolle Programmkoppelung hintereinander auszuführen. Elektronische Rechner lösen zwar keine Probleme, mit ihnen lassen sich aber gefundene Problemlösungen schneller und präziser realisieren als mit Nomogrammen. Eine Grafik soll deshalb nur noch dazu dienen, das Ergebnis zu veranschaulichen. Das Ergebnis selbst liefert der Rechner schneller und zuverlässiger.

Die Auswertung der Meßdaten und die statistischen Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit werden mit dem programmierbaren Taschenrechner HP-41C durchgeführt. Die hierzu benutzten Programme sind im Anhang dieser Arbeit aufgelistet. Die Anleitungen zur Entwicklung der verschiedenen Programme sind bei ANDERSEN/ZIRPEL (2), BOSCH (3), DIEM/LENTNER (12), GOSMANN (13), KAISER/GOTTSCHALK (16), KREYSZIG (19) und RIEDWYL (26) zu finden. Die Auswertung der vorliegenden Meßdaten orientiert sich an dem Inhalt des Kapitels "Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen" in CAVALLI-SFORZA (4). Die dort gemachten Angaben sind für die Konzentrationsbestimmung von Antibiotika mit Hilfe der ADM zu empfehlen. Bei der eigenen Auswertung werden die Datenpaare aus Tabelle 2 gruppenweise in den Rechner zur Regressionsanalyse eingegeben, wobei die Eichprobenkonzentrationswerte zur Lineartransformation rechnerintern dekadisch logarithmiert werden. Der Rechner ermittelt über das Programm LIN-REG die auf Seite 14 aufgeführten Regressionskenndaten. Besonders aussagekräftig sind die Berechnungen von SQ (Summe

der quadratischen Abweichung von der errechneten Regressionsgeraden), SQ_1 (Summe der quadratischen Abweichungen der Gruppenmittel von der errechneten Geraden) und SQ_2 (Summe der quadratischen Abweichungen innerhalb der Gruppen) (k, l, m). Aus SQ läßt sich leicht die mittlere Streuung der Einzelwerte um die Regressionsgerade (Restvarianz $s^2_{y.x}$) berechnen. Sie ist die Varianz von y, nachdem der Einfluß der Streuung von x ausgeschaltet worden ist. Sie soll in der Regel kleiner sein als s^2_y (12).

Die Quadratsummen der Streuungen SQ, SQ_1 und SQ_2 werden für den Test des Stichprobenumfanges auf Linearität benötigt. Die Oberprüfung der Stichprobendaten auf linear-regressiven Verlauf ist notwendig, da über die Geradenanpassung mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate zwar diejenige lineare Kurve errechnet wird, von der die Summe der quadratischen Abweichungen ein Minimum annimmt, jedoch nicht zu erfahren ist, ob die Regression der Stichprobendaten linear ist. Wird aus einem nichtlinear-regressiven Stichprobenpool eine Gerade nach der Methode der kleinesten Quadrate errechnet, so ist die Anpassung schlecht, der Fehler bei der Konzentrationsbestimmung groß. Dies wird u. a. am Schätzwert r für den Korrelationskoeffizienten zu erkennen sein.

Lineare Kurven sind leichter darzustellen. Sie zeigen zudem sehr deutlich Störeffekte an: z. B., wenn die Standard- und die Wirkungsgerade der Untersuchungsprobe bzw. des Vergleichsstandards nicht mehr parallel verlaufen (Grund: z. B. ein zweites Antibiotikum in der Untersuchungsprobe). Die in einen Vergleich einbezogenen Wirkungsgeraden werden daher stets auf Parallelität überprüft (Programm PAR u. TEST im Anhang).

Eine sichere Konzentrationsbestimmung erfolgt nur im Bereich der Eichprobenkonzentrationen. Bereits bei der Versuchsplanung wird also auf eine Zentrierung der Eich- und Untersuchungsproben geachtet, da Probenanalysen außerhalb

des Eichprobenkonzentrationsbereiches nicht mehr im Kontrollbereich der Regression liegen. Im Zweifelsfalle werden in Vorversuchen die Konzentrationsbereiche der Untersuchungsproben ermittelt und gegebenenfalls durch Verdünnen mit homologem Lösungsmittel (z. B. eigenaktivitätsfreies Poolserum) auf den Konzentrationsbereich des Standards zentriert.

Eine kritische Beurteilung der Beziehung zwischen Gentamicinkonzentration und Hemmhofdurchmesser verlangt auch die Angabe des Konfidenzbereiches für den Regressionskoeffizienten β und den Achsenabschnitt α (Programm KONF b und KONF a im Anhang). Die Konfidenzbereiche werden auf dem 95%-Niveau angegeben.

Beide lassen sich für die Schätzung des mittleren Fehlers bei der ermittelten Konzentration der Untersuchungsprobe mit Hilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetzes verwenden (Programm FEHLER im Anhang).

Der Test beim Regressionskoeffizienten (Programm TEST b im Anhang) hilft bei der Beurteilung der Frage, ob zwischen Wirkstoff und beobachteter Reaktion ein vorausgesagter Zusammenhang besteht oder nicht. Sein Einsatz bei diesen Untersuchungen ist hier allerdings nicht notwendig gewesen, da sich bereits grafisch sehr deutlich die Abhängigkeit der Hemmhofgröße von der Gentamicinkonzentration zeigte.

Zu jeder Regression wird schließlich der Vertrauensbereich auf dem 95%-Niveau angegeben (Programm KONF MY im Anhang).

6.3 Diskussion zur statistischen Qualitätskontrolle

Eine sichere Bewertung der im eigenen Labor ermittelten Konzentrationswerte kann nur mit Hilfe von Kontrollproben erfolgen, deren Konzentrationen für die Richtigkeitskontrolle bekannt sein müssen, dagegen für die Präzisionskontrolle nicht bekannt zu sein brauchen (27).

Über die Notwendigkeit einer Qualitätskontrolle im eigenen Labor und durch Ringversuche schreiben REEVES & BYWATER (24). Die Autoren schildern in ihrer sehr ausführlichen Arbeit die Durchführung von vier nationalen Qualitätskontroll-Studien (Gruppe A, B, C und D). Die Ergebnisse sind überwiegend "in hohem Maße irreführend". Die in vier Gruppen eingeteilten Laboratorien hatten die Aufgabe, die Gentamicinkonzentrationen von zentral verteilten Proben mit eigenen und zentral verteilten Standards zu bestimmen. Als Maß für die Güte der Durchführung der Konzentrationsbestimmung legen die Autoren den mittleren prozentualen Fehler vom sogenannten wahren Wert (d. i. der rein rechnerisch ermittelte Konzentrationswert der jeweiligen Probe) plus die zweifache Standardabweichung bei der Beurteilung der einzelnen Laboratorien zugrunde: " mean $\pm$ 2·SD". Das Prädikat "gut" wird vergeben, wenn für sämtliche zu bestimmenden Konzentrationen die o. g. Abweichung nicht mehr als 25 Prozent vom sog. wahren Wert (fiktiver Konzentrationswert) beträgt, "mangelhaft", wenn die Abweichung 26 bis 50 Prozent erreicht, und "in hohem Maße irreführend", wenn die Abweichung größer als 50 Prozent ist. In der von REEVES & BYWATER betreuten Gruppe D bestimmten 50 Prozent (entspricht 46 Teilnehmern) der teilnehmenden Laboratorien die Konzentrationen der ausgeteilten Proben mit einer Abweichung vom sog. wahren Wert, die 50 Prozent und mehr betrug. 32 Prozent der Teilnehmer lieferten Ergebnisse ab, die mit "mangelhaft" bewertet wurden. Nur 18 Prozent (entspricht 17 Ringversuchsteilnehmern) erreichten mit ihren Resultaten das Prädikat "gut". Die Ergebnisse der Gruppen A, B und C gleichen denen der Gruppe D. Fehlende Standardisierung der Methoden und der hierfür verwendeten Materialien, ungeeignete Küvetten (z. B. einfache Kunststoffpetrischalen) und Meßgeräte (z. B. Schieblehren oder Lineale zum Ausmessen der Hemmhofdiameter) sowie oberflächliche Handhabung bei der Herstellung von Gußplatten und Standardlösungen sind für die schlechten Ergebnisse verantwortlich zu machen. Eine

Qualitätssteigerung ist nach Meinung der Autoren nur durch eine interne Kontrolle (statistische Qualitätskontrolle) möglich. Zentral gesteuerte Ringversuche sollen den Erfolg der internen Laborkontrolle in regelmäßigen Abständen überprüfen.

WASHINGTON II (32) berichtet auf dem 10. Internationalen Chemotherapiekongreß über das Ergebnis einer 1975 in den USA durchgeführten Untersuchung zur Qualität der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der ADM. Eine Probe, die 6 mg Gentamicin/l Serum enthält, ist an 129 Laboratorien zur Konzentrationsbestimmung ausgeteilt worden. Der Bereich der ermittelten Konzentrationswerte schwankt zwischen 0 und 32 mg/l. Mangelnde interne Standardisierung sowie die Mißachtung technischer Details bei der Durchführung der Konzentrationsbestimmung werden als Hauptursache für diese sehr schlechten Ergebnisse genannt.

Zu den sehr allgemein gehaltenen Vorschlägen von REEVES & BYWATER, regelmäßige interne Laborkontrollen vorzuschreiben und externe Kontrollen (Ringversuche) in bestimmten Abständen zur Qualitätsüberprüfung anzubieten, können aus eigener Erfahrung die folgenden Empfehlungen zur statistischen Qualitätskontrolle der Konzentrationsbestimmung von Antibiotika mit dem Lochplattenverfahren nach der ADM gemacht werden:

1. Die Konzentrationsbestimmung von Untersuchungsproben soll immer zusammen mit Präzisionskontroll-, Richtigkeitskontroll- und Eichprobe auf einer Lochplatte durchgeführt werden. Die Analyse der Probe nach Möglichkeit immer doppelt in zwei Serien, d. h. auf zwei Gußplatten (am selben Tag) durchführen.
2. Die verwendeten Kontrollproben zur Oberprüfung der Richtigkeit (Sollproben) sollen möglichst in Zusammenarbeit mit nationalen oder sogar internationalen Referenzlaboratorien hergestellt werden.

Über den Vergleich der Varianzen im F-Test läßt sich zuverlässig erkennen, mit welcher Präzision die teilnehmenden Referenzlaboratorien die als Sollproben vorgesehenen Proben analysieren. Der Test dient als Entscheidungshilfe dafür, ob die indirekt über die Varianzen kontrollierten Datengruppen der einzelnen Teilnehmer zusammengefaßt werden dürfen oder nicht.
Im anschließenden t-Test wird festgestellt, ob sich die Mittelwerte aus den Probenanalysen der Referenzlaboratorien statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Mit diesem Test läßt sich entscheiden, ob die einzelnen Mittelwerte zu einem gemeinsamen Mittelwert als Sollwert zusammengefaßt werden dürfen oder ob gegebenenfalls die Konzentrationswerte einiger Teilnehmer aufgrund signifikanter, d. h. systematischer Abweichungen und damit mangelnder Richtigkeit der durchgeführten Analysen aus dem übrigen Datenpool entfernt werden müssen.
Ein gemeinsam von Referenzlaboratorien festgelegter mittlerer Analysenwert als Sollwert für eine Richtigkeitskontrollprobe ist zur Oberprüfung eher geeignet als der fiktive (sog. "wahre") Wert einer Kontrollprobe. Ihm fehlt die Qualifikation durch jene Prüfkriterien, denen sich im F-Test und t-Test die Analysenwerte mehrerer Referenzlaboratorien unterziehen müssen: Präzision und Richtigkeit.

3. Zur Oberprüfung der Präzision im eigenen Labor soll neben zwei Richtigkeitskontrollproben eine Präzisionskontrollprobe in 20 aufeinanderfolgenden Vorversuchen (1 Versuch = 1 Lochplatte) analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Vorserie dienen der Festlegung von Kontrollgrenzen für die Präzisionskontrolle bei routinemäßigen Untersuchungen im eigenen Labor.

Die Analysenergebnisse der Präzisionskontrollprobe in der Vorserie geben Auskunft über die Güte der Reproduzierbarkeit des Lochplattenverfahrens beim Anwender. Das Verfahren ist für die Konzentrationsbestimmung dann geeignet, wenn die relative Standardabweichung 5 (bzw. 10) Prozent vom errechneten Analysenmittelwert aus der Vorserie nicht überschreitet (27).

Die aus den Einzelresultaten der Sollprobenanalysen gebildeten Mittelwerte werden mit den Sollwerten in einem modifizierten t-Test verglichen. Dieser bereits auf die Sollproben-Vorserienresultate angewandte t-Test gibt rechtzeitig Auskunft darüber, ob im eigenen Labor systematische Fehler bei der Probenanalyse gemacht werden.

Die Analyse darf nicht mehr als "richtig" beurteilt werden, wenn die relative Abweichung des Analysenwertes vom vorgegebenen Sollwert diesen um 10 (bzw. 20) Prozent überschreitet (27).

4. Die in der täglichen Routine ermittelten Konzentrationswerte der in jeder Serie mitzuführenden Präzisionskontrollproben sowie der in jeder vierten Serie mitzuführenden Sollproben sollen auf Kontrollkarten zur Oberwachung der quantitativen Analysequalität im eigenen Labor protokolliert werden (27).
5. Die Auswertung soll mit Hilfe eines programmierbaren Rechners erfolgen zur schnelleren und sicheren Oberprüfung von Linearität und Parallelität der Regressionen und der exakteren Ermittlung der Konzentrationswerte.

7. Zusammenfassung

Die mikrobiologische Bestimmung von Antibiotikakonzentrationen mit Hilfe der Agardiffusionsmethode (ADM) gilt als traditionelles Referenzverfahren. Allerdings wurde in Studien in England und den USA festgestellt, daß die praktische Anwendung dieser Methode in vielen Laboratorien zu erheblichen Fehlbestimmungen führt.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb verschiedene Einflüsse auf die resultierenden Meßergebnisse untersucht. U. a. zeigt sich, daß weder der pH-Wert des Lösungsmittels (Poolserum) noch Bilirubinkonzentrationen bis 140 mg/l Serum einen signifikant meßbaren Einfluß auf die Gentamicinaktivität haben.

Aus den eigenen Ergebnissen und der Diskussion von Angaben im Schrifttum werden Empfehlungen für eine standardisierte Durchführung der ADM abgeleitet. Mit Hilfe der angewandten Fehlerrechnung und statistischer Methoden wird die Zuverlässigkeit der ADM beurteilt, wenn sie unter solchen standardisierten Bedingungen angewandt wird. Bei sorgfältiger Durchführung der Methode ist der mittlere fortgepflanzte Fehler bei der Herstellung der Eichprobenkonzentrationen nicht größer als 1 %. Die mittleren Fehler bei der Konzentrationsbestimmung einer Serumprobe sind nicht größer als 10 %. Geeignete Kontrollmaßnahmen für die routinemäßige Konzentrationsbestimmung von Antibiotika werden empfohlen. Ein Modell zur statistischen Qualitätskontrolle solcher Untersuchungen wird vorgestellt. Es kann auch für die Durchführung von nationalen oder internationalen Ringversuchen nützlich sein.

8. Anhang

Anhang I (Programme zur Regressionsanalyse)

Die hier vorgestellten Programme wurden für den Taschenrechner HP-41C geschrieben. Sie können ohne Schwierigkeiten auch für den TI 59 bzw. TI 58 verwendet werden.

Programm 1:	LINREG	(bestimmt m, n; berechnet lgx, y, b, a, s^2_{lgx}, s^2_y, s_{lgxy}, r, SQ, SQ_1, SQ_2, $s^2_{y\cdot lgx}$ (siehe auch Seite 14))
Programm 2:	FEHLER	(berechnet den mittleren Fehler bei a und b)
Programm	ANZ*	
Programm	LOE*	
Programm	LG*	
Programm	SQ Y*	
Programm	GAMMA*	
Programm 3:	KONZ	(berechnet die Konzentration x_p, gibt den mittleren Fehler bei x_p an, schätzt die Vertrauensgrenzen zu x_p)
Programm 4:	KONF b	(berechnet den Konfidenzbereich für a und b)
Programm 5:	TEST b	(testet den Regressionskoeffizienten b gegen Null)
Programm 6:	KONF MY	(berechnet den Konfidenzbereich für MY bei vorgegebener Regression)
Programm 7:	TESTLIN	(testet die Regression auf Linearität)
Programm 8:	TESTPAR	(testet die Regressionskoeffizienten der Regressionen auf Gleichheit = Parallelitätstest)

*) Hierbei handelt es sich um selbständige Unterprogramme, die nicht im USER-Modus aufgerufen werden können.

Zu Programm 1 (LINREG): Anpassung einer Geraden (lineare Regression) oder Logarithmusfunktion an vorgegebene Wertepaare (x_i, y_{ij})

Die Anpassung der Kurven an die Datenpaare (x_i, y_{ij}) erfolgt nach der GAUSSschen Methode der kleinsten Quadrate. Ihr liegt die Oberlegung zugrunde, daß die Kurve die Regression dann gut repräsentiert, wenn die Summe der Quadrate aller Abstände der Punkte (x_i, y_{ij}) von der Kurve minimal wird. Die Summe der Abstandsquadrate

$$SQ = S(y_{ij} - (Bx_i + A))^2 \qquad (1)$$

ist eine Funktion von A und B (SQ = f(A,B). B ist das Steigungsmaß der Kurve und heißt Regressionskoeffizient. A ist der Achsenabschnitt. Beide Parameter bestimmen die Lage der Kurve im Koordinatenkreuz. Die Funktion SQ hat genau an der Stelle eine Minimum, an der die partiellen Ableitungen der Funktion f(A,B) nach A und B null sind:

$$f'(A,B)_A = 0 \qquad (1.1)$$

$$f'(A,B)_B = 0 \qquad (1.2)$$

mit

$$f'(A,B)_A = -2S(y_{ij} - Bx_i - A) \qquad (1.3)$$

und

$$f'(A,B)_B = -2S(x_i y_{ij} - Bx_i^2 - Ax_i) \qquad (1.4)$$

Das aus (1.1) und (1.2) folgende äquivalente Gleichungssystem läßt sich mit den Ausdrücken in (1.3) und (1.4) umformen zu

$$\sum y_{ij} = B \sum x_i + nA \qquad (1.5)$$

und

$$\sum x_i y_{ij} = B \sum x_i^2 + A \sum x_i \qquad (1.6)$$

sodaß für die zu bestimmenden Parameter A und B aus den Gleichungen (1.5) und (1.6) folgt:

$$A = y + B \cdot x \qquad (1.7)$$

und

$$B = \frac{\sum x_i y_{ij} - n\bar{x}\bar{y}}{\sum x_i^2 - n\bar{x}} \qquad (1.8)$$

Die Größen A, B, x und y werden entsprechend des vorliegenden Funktionstyps wie folgt definiert:

Regression	A	B	x	y	
Gerade	a	b	x_i	y_{ij}	$(y_{ij})^*$
Logarithmus-funktion	a	b	$\lg x_i$	y_{ij}	$(y_{ij})^*$

$(y_{ij})^*$, z. B. Hemmhofdurchmesser-Quadrat, wird dann gewählt, wenn hierdurch die bessere formale Beziehung zwischen x und y erreicht wird (s. S. 36). Das Programm ist so geschrieben, daß der Rechner die Datenpaare (x_1,y_{11}), $(x_1,y_{12}),\ldots,(x_1,y_{1j})$, ..., (x_i,y_{ij}) in der angegebenen Reihenfolge verarbeitet und zur Eingabe des folgenden Wertes auffordert. Die mit x beschriebenen Konzentrationswerte

werden über eine FLAG-Steuerung rechnerintern dekadisch logarithmiert. Ebenso werden die mit y beschriebenen Hemmhofdurchmesserwerte über eine FLAG-Steuerung rechnerintern quadriert. Für eine anderweitige Verwendung dieses Programmes außer der hier vorgesehenen kann das betreffende FLAG zu Beginn der Programmausführung jeweils gelöscht werden. In diesen Fällen unterbleibt die Logarithmierung der x-Werte bzw. die Quadrierung der y-Werte.

Der Rechner befindet sich im USER-Modus. Das Programm LINREG ist der Taste $\sum+$ zugeordnet.

	Anzeige
1. Eröffnung des Programmes: Drücke Taste +: Sämtliche Speicher werden gelöscht. Flag 00 und 01 werden gesetzt.	LINREG
2. Fordert zur Eingabe des 1. x-Wertes auf: (An dieser Stelle können Flag 00 und/oder 01 gelöscht werden: CF 00, CF 01.) Gebe 1. x-Wert ein. Drücke R/S-Taste	KONZ 1
3. Fordert zur Eingabe des 1. y-Wertes auf: Gebe 1. y-Wert einer Gruppe ein. Drücke R/S-Taste. Wenn alle y-Werte einer Gruppe eingegeben sind, gebe Null ein: Die eingegebenen Daten werden verarbeitet.	Hemmhof 1 BERECHNE SQ_2
Der Rechner beginnt wieder bei Schritt 2: Dann folgt wieder Schritt 3 usw.	KONZ 2

Sind auch alle x-Werte eingegeben, gebe Null ein:	ERGEBNISSE
a) Anzahl der Gruppen (m)	.....
b) Mittelwert der x-Werte	.....
Drücke R/S-Taste.	
c) Mittelwert der y-Werte	.....
Drücke R/S-Taste.	
d) Regressionskoeffizient RK (b)	.....
Drücke R/S-Taste.	
e) Korrelationskoeffizient KK (r)	.....
Drücke R/S-Taste.	
f) Achsenabschnitt AA (a)	.....
Drücke R/S-Taste.	
Programmende	ENDE

Wird danach noch einmal die R/S-Taste gedrückt, so springt der Programmzeiger wieder an den Anfang von LINREG ohne die Datenspeicher R 34 bis R 50 zu löschen. Die nächste Regressionsrechnung kann beginnen.

Der Rechner speichert hintereinander die Parameter

a) Anzahl der Stichproben (n)

b) Regressionskoeffizient (b)

c) Restvarianz ($s^2_{y \cdot x}$)

d) Summe der Quadratischen Abweichungen der x-Werte (SQ_x)

für drei Regressionen, die dann im Test auf Parallelität (Programm TEST PAR, Taste SIN) miteinander verglichen werden können.

Werden die Daten für eine vierte Regression eingegeben, so löscht der Rechner diese gespeicherten Parameter der drei vorhergehenden Regressionen, die sich in den Datenspeichern R 34 bis R 50 befinden, automatisch.

Die Programmbefehle werden als Zeilen fortlaufend aufgelistet und numeriert:

```
  001 LBL LINREG
  002 XEQ CLRG
  003 SF 00
  004 SF 01
* 005 LBL 00
  006 LINREG
  007 XEQ ANZ
  008 000.033
  009 XEQ LOE
* 010 LBL 01
  011 1
  012 ST+ 13
  013 FIX 0
  014 KONZ
  015 ARCL 13
  016 XEQ PROMPT
  017 x = 0?
  018 GTO 05
  019 FS? 00
  020 XEQ LG
  021 STO 00
  022 x^2
  023 STO 01
* 024 LBL 02
  025 1
  026 ST+ 08
  027 HEMMHOF
  028 ARCL 08
  029 XEQ PROMPT
  030 x = 0?
  031 GTO 03
  032 FS? 01
  033 XEQ SQ Y
  034 STO 02
  035 ST+ 26
  036 x^2
  037 ST+ 04
  038 RCL 00
  039 RCL 02
  040 *
  041 ST+ 05
  042 1
  043 ST+ 14
  044 RCL 02
  045 ST+ 06
  046 x^2
  047 ST+ 07
  048 GTO 02
* 049 LBL 03
  050 BERECHNE SQ2
  051 AVIEW
  052 XEQ PSE
  053 1
  054 ST- 08
  055 RCL 00
  056 RCL 08
  057 *
  058 ST+ 15
  059 RCL 01
  060 RCL 08
  061 *
  062 ST+ 09
  063 RCL 07
  064 RCL 06
  065 x^2
  066 RCL 08
  067 1/x
  068 *
  069 -
  070 ST+ 16
  071 RCL 06
  072 x^2
  073 RCL 08
  074 •/•
  075 ST+ 03
  076 RCL 06
  077 ST+ 12
  078 RCL 07
  079 ST+ 28
  080 006.008
  081 XEQ LOE
  082 GTO 01
* 083 LBL 05
  084 ERGEBNISSE
  085 XEQ ANZ
  086 1
  087 ST- 13
  088 FIX 0
  089 GRUPPEN =
  090 ARCL 13
  091 XEQ ANZ
* 092 LBL 06
  093 RCL 14
```

```
094 1
095 -
096 1/x
097 STO 17
098 RCL 15
099 x^2
100 STO 23
101 RCL 14
102 ST•/• 15
103 ST•/• 26
104 RCL 14
105 2
106 -
107 RCL 09
108 RCL 14
109 *
110 RCL 23
111 -
112 *
113 STO 24
114 RCL 09
115 STO 25
116 FIX 4
117 FS? 00
118 GTO 17
119 Mi x =
120 ARCL 15
121 XEO ANZ
122 RTN
* 123 LBL 08
124 RCL 15
125 x^2
126 RCL 14
127 *
128 ST- 09
129 RCL 17
130 RCL 09
131 *
132 STO 18
133 Mi y =
134 ARCL 26
135 XEQ ANZ
136 RTN
* 137 LBL 09
138 RCL 26
139 x^2
140 RCL 14
141 *
142 ST- 04
143 RCL 17
144 RCL 04
145 *
146 STO 31
147 RCL 14
148 RCL 15
149 RCL 26
150 *
151 *
152 ST- 05
153 RCL 17
154 RCL 05
155 *
156 STO 19
157 RCL 19
158 RCL 18
159 •/•
160 STO 20
161 RK =
162 ARCL 20
163 XEQ ANZ
164 RTN
165 RCL 34
166 x = 0?
167 GTO 10
168 GTO 11
* 169 LBL 10
170 35.03701
171 STO 34
* 172 LBL 11
173 RCL 17
174 1/x
175 RCL 31
176 RCL 18
177 RCL 20
178 x^2
179 *
180 -
181 *
182 STO 21
183 RCL 14
184 2
185 -
186 •/•
187 STO 32
188 STO IND 34
189 ISG 34
190 GTO 12
* 191 LBL 12
192 RCL 38
193 x = 0?
194 GTO 13
195 GTO 14
```

```
* 196 LBL 13
  197 39.04101
  198 STO 38
* 199 LBL 14
  200 RCL 20
  201 STO IND 38
  202 ISG 38
  203 GTO 15
* 204 LBL 15
  205 RCL 42
  206 x = 0?
  207 GTO 16
  208 GTO 17
* 209 LBL 16
  210 43.04501
  211 STO 42
* 212 LBL 17
  213 RCL 14
  214 STO IND 42
  215 ISG 42
  216 GTO 18
* 217 LBL 18
  218 RCL 46
  219 x = 0?
  220 GTO 19
  221 GTO 20
* 222 LBL 19
  223 47.04901
  224 STO 46
* 225 LBL 20
  226 RCL 09
  227 STO IND 46
  228 ISG 46
  229 GTO 21
* 230 LBL 21
  231 RCL 16
  232 STO 30
  233 RCL 12
  234 x^2
  235 RCL 14
  236 •/•
  237 ST- 28
  238 RCL 12
  239 x^2
  240 RCL 14
  241 •/•
  242 ST- 03
  243 RCL 20
  244 x^2
  245 RCL 09
  246 *
  247 STO 27
  248 ST- 03
  249 RCL 03
  250 STO 29
  251 RCL 30
  252 x = 0?
  253 GTO 22
  254 RCL 14
  255 RCL 13
  256 -
  257 ST•/• 30
  258 RCL 13
  259 2
  260 -
  261 ST•/• 03
  262 RCL 30
  263 ST•/• 03
  264 RCL 03
  265 STO 33
* 266 LBL 22
  267 RCL 05
  268 RCL 09
  269 RCL 04
  270 *
  271 SQRT
  272 •/•
  273 STO 11
  274 KK =
  275 ARCL 11
  276 XEQ ANZ
  277 RTN
* 278 LBL 23
  279 RCL 26
  280 RCL 20
  281 RCL 15
  282 *
  283 -
  284 STO 22
  285 AA =
  286 ARCL 22
  287 XEQ ANZ
  288 RTN
  289 ENDE
  290 XEQ ANZ
  291 RTN
* 292 LBL 24
  293 RCL 50
  294 x = 0?
  295 GTO 25
  296 GTO 26
* 297 LBL 25
```

```
  298 01.00301        301 ISG 50          304 034.050
  299 STO 50          302 GTO 00          305 XEQ LOE
* 300 LBL 26        * 303 LBL 27          306 GTO 00
```

Datenspeicher-Verteilung für das Programm LINREG

R 00	x_i	R 13	m	R 26	$\bar{y}$
R 01	x_i^2	R 14	n	R 27	SQ_3
R 02	y_{ij}	R 15	$\bar{x}$	R 28	SQ_y
R 03	v*	R 16	SQ_2	R 29	SQ_1
R 04	SQ_y	R 17	$1/(n-1)$	R 30	s^2_x
R 05	SP_{xy}	R 18	s^2_x	R 31	s^2_y
R 06	$\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}$	R 19	s_{xy}	R 32	$s^2_{y\cdot x}$
R 07	$\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2$	R 20	b	R 33	v*
R 08	n_i	R 21	$SQ_{y\cdot x}$	R 34 bis R 49 für die Schleifensteuerung der Größen n, b, SQ_x und $s^2_{y\cdot x}$ zur weiteren Verwendung im Programm TESTPAR.	
R 09	SQ_x	R 22	a		
R 10	frei	R 23	$(\sum x_i n_i)^2$		
R 11	r	R 24	(n-2)(nR25-R23)		
R 12	$\sum_{i=1}^{m} \sum_{j=i}^{n_i} y_{ij}$	R 25	$\sum x_i^2 n_i$	*) v:= Prüfquotient für Programm TEST LIN	

Datenspeicherverteilung in LINREG

lokales Label		Datenspeiche
LBL 00:	zeigt "LINREG" an, löscht Datenspeicher von R 00 bis R 33 FLAG 00 (lgx) und FLAG 01 (y^2) werden gesetzt	
LBL 01:	zählt Anzahl Gruppen m, zeigt diese jeweils an, fordert zur Eingabe von x_S auf, speichert jeweils x_S und x_S^2	ST+ 13 STO 00, STO
LBL 02:	zählt Anzahl der Hemmhöfe y_{ij_S} einer Gruppe n_{i_S}, zeigt diese jeweils an, fordert zur Eingabe von y_{ij_S} auf, speichert y_{ij_S}, summiert y_{ij_S} bis n_S, summiert $y_{ij_S}^2$ bis n_S, summiert $x_{i_S} y_{ij_S}$ bis n_S, summiert 1 bis n_S summiert y_{ij_S} bis n_{i_S}, summiert $y_{ij_S}^2$ bis n_{i_S}	ST+ 08 STO 02 ST+ 26, ST+ ST+ 05, ST+ ST+ 06, ST+
LBL 03:	summiert $x_{i_S} \cdot n_{i_S}$ bis m, summiert $x_{i_S}^2 \cdot n_{i_S}$ bis m, berechnet SQ_2 in R 16, summiert Inhalt von R 06 in R 12, summiert Inhalt von R 07 in R 28, löscht Datenspeicher R 06, R 07, R 08	ST+ 15 ST+ 09, ST+ ST+ 12, ST+
LBL 04:	wird in SBR LOE als Schleifenadresse verwendet (siehe dort; LOE wird als selbständiges Unterprogramm verwendet)	
LBL 05:	ERGEBNISSE, zeigt "ERGEBNISSE" an 1. zeigt endgültige Anzahl der Gruppen m an	RCL 13
LBL 06:	2. berechnet und speichert $1(n_{i_S} - 1)$ 3. berechnet und speichert $(\sum x_{i_S} \cdot n_{i_S})^2$ 4. berechnet $\bar{x}$ 5. berechnet $\bar{y}$	STO 17 STO 23 ST/ 15 ST/ 26

	6. berechnet $(n_S-2)(n\cdot\sum x_{i_S}{}^2\cdot n_{i_S} - (\sum x_{i_S}\cdot n_{i_S})^2)$	STO 24
	7. überschreibt Inhalt von R 09 nach R 25	STO 25
	8. zeigt $\bar{x}$ bzw. $\overline{lgx}$ an	
LBL 07:	dient als interne SBR zum Aufruf von Mi LOG x (siehe dort)	
LBL 08:	9. speichert SQ_{x_i}	ST- 09
	10. speichert s^2_x bzw. s^2_{lgx}	STO 18
	11. zeigt $\bar{y}$ an	
LBL 09:	12. speichert $SQ_{y_{ij}}$	ST- 04
	13. speichert s^2_y bzw. s^2_{y2}	STO 31
	14. speichert SP_{xy}	ST- 05
	15. speichert s_{xy}	STO 19
	16. berechnet und speichert b	STO 20
	17. zeigt b an	
LBL 10:	18. speichert Schleifenzahl 35.03701 in	STO 34
LBL 11:	19. berechnet und speichert $SQ_{y\cdot x}$	STO 21
	20. berechnet und speichert $s^2_{y\cdot x}$	STO 32
LBL 12:	21. kontrolliert Inhalt von R 38	
LBL 13:	22. speichert Schleifenzahlen 39.04101	STO 38
	bis 43.04501 und 47.04901	STO 42, STO 46
LBL 20:	und kontrolliert deren Inhalte	
LBL 21:	23. überschreibt Inhalt von R 16 nach	STO 30
	24. berechnet und speichert SQ_y	ST- 28
	25. berechnet und speichert SQ_3	STO 27
	26. berechnet und speichert SQ_1	STO 29
	27. berechnet den Prüfquotienten v für den Test auf Linearität	ST- 03
	28. überschreibt Inhalt von R 03 nach	STO 33
LBL 22:	29. berechnet und speichert r	STO 11
	30. zeigt KK = r an	
LBL 23:	31. berechnet und speichert a	STO 22
	32. zeigt AA = a an	

Zu Programm 2 (FEHLER): Mit diesem Programm werden die mittleren Unsicherheiten der beiden Kurvenparameter a (= Achsenabschnitt) und b (= Regressionskoeffizient) s_a und s_b berechnet. Die Ergebnisse aus LINREG werden um s_a und s_b ergänzt und werden korrekt angegeben mit

$$a \pm s_a,$$

$$b \pm s_b.$$

Sollen s_a und s_b auf der Basis eines statistischen Signifikanzniveaus angegeben werden, so lautet die korrekte Ergebnismitteilung

$$a \pm z \cdot s_a,$$

$$b \pm z \cdot s_b.$$

z ist der Faktor aus der Standardnormalverteilung zu einem bestimmten Wahrscheinlichkeitsniveau α.

Die mittleren Unsicherheiten von a und b werden wie folgt ermittelt:

$$s_a^2 = \frac{\sum (bx_i + a - y_{ij})^2 \cdot \sum x_i^2}{(n-2)\left[n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\right]}$$

$$s_b^2 = \frac{\sum (bx_i + a - y_{ij})^2 \cdot n}{(n-2)\left[n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\right]}$$

Der Taschenrechner zeigt die mittleren Unsicherheiten s_a und s_b an.

Programmauflistung zu Programm 2 (FEHLER)

```
001 LBL FEHLER      010 ·/·          019 *
002 FEHLER          011 SQRT         020 RCL 24
003 XEQ ANZ         012 STO 00       021 ·/·
004 000.012         013 FEHL b =     022 SQRT
005 XEQ LOE         014 ARCL 00      023 STO 01
006 RCL 21          015 XEQ ANZ      024 FEHL a =
007 RCL 14          016 RTN          025 ARCL 01
008 *               017 RCL 21       026 XEQ ANZ
009 RCL 24          018 RCL 25       027 END
```

Programmauflistung der selbständigen Unterprogramme ANZ, LOE, LG und SQ Y

```
001 LBL ANZ         001 LBL LOE      001 LBL LG
002 XEQ AON         002 0            002 LOG
003 AVIEW         * 003 LBL 04       003 END
004 XEQ PSE         004 STO IND Y
005 XEQ AOFF        005 ISG Y        001 LBL SQ Y
006 END             006 GTO 04       002 x^2
                    007 END          003 END
```

Programmauflistung des selbständigen Unterprogrammes GAMMA

Dieses Programm wird für die Programme 4 (KONF b), 5 (TEST b) und 6 (KONF MY) benötigt. Es fordert zur Eingabe der Konfidenzzahl γ auf (95% oder 99%), berechnet den Funktionswert p zu einem Tabellenwert c aus der t-Verteilung, fordert zur Eingabe dieses Tabellenwertes c auf, der mit (n - 2) Freiheitsgraden aus der Tabelle der t-Verteilung zu entnehmen ist.

```
001 LBL GAMMA       006 2            011 XEQ ANZ
002 GAMMA ?         007 ·/·          012 c = ?
003 PROMPT          008 STO 02       013 PROMPT
004 1               009 p =          014 END
005 +               010 ARCL 02
```

Zu Programm 3 (KONZ)

Mit Programm KONZ lassen sich

1. die Konzentration x_P einer Probe P,
2. der mittlere fortgepflanzte Fehler m_{x_P} bei der Konzentration x_P,
3. die Vertrauensgrenzen (fiducial limits) $L_{x_{1P}}$ und $L_{x_{2P}}$ zu dem aus der Regressionsgeraden Y_S berechneten Konzentrationswert x_P und
4. die Vertrauensgrenzen D_1 und D_2 zum horizontalen Abstand D zwischen dem Konzentrationswert x_P der Probe P und dem auf gleicher Höhe y_P liegenden Konzentrationswert x_S der Eichkurve Y_S

berechnen.

Die Angabe des Konzentrationswertes x_P erfolgt mit "KONZ= ... Der mittlere fortgepflanzte Fehler m_{x_P} wird vom Rechner mit dem Buchstaben "M", die symmetrisch um x_P liegende untere und obere Fehlergrenze mit "M1= ..." und "M2= ..." gekennzeichnet. Die asymmetrisch um x_P (aber symmetrisch zu $(b(y_P - y_S)/B) + x_S$) liegenden Vertrauensgrenzen werden vom Rechner mit "L1= ..." und "L2= ..." symbolisiert. Für die Angabe der Vertrauensgrenzen zum horizontalen Abstand D verwendet der Rechner die Zeichen "D1" und "D2". Der Abstand D selbst wird entsprechend mit "D" angezei

Der Rechner fordert zunächst zur Eingabe des oder der y_P-Wert (z. B. Hemmhofdurchmesserwerte) derselben Probe P auf, und zwar lange, bis nach der letzten Meßwerteingabe die Zahl Null eingege wurde. In der Anzeige erscheint dann der berechnete Konzentratio wert x_P. Zu Beginn der Schätzung der Vertrauensgrenzen fordert d Rechner zur Eingabe des t-Wertes auf. In der Anzeige erscheint d Symbol "T = ?". Entsprechend dem gewählten Signifikanzniveau Alp und der Anzahl der Freiheitsgrade der Stichprobe für die Regress (n_S - 2) ist dieser Wert der Tabelle zur Student-Verteilung zu e nehmen. Nach der Eingabe von t können die Schätzdaten für die Ve trauensgrenzen sowie der Abstand D über die Taste R/S hintereina der in der oben angegebenen Reihenfolge abgerufen werden.

```
  001 LBL KONZ
  002 KONZ
  003 XEQ ANZ
  004 002.012
  005 XEQ LOE
* 006 LBL 00
  007 1
  008 ST+ 05
  009 FIX 0
  010 HEMMHOF
  011 ARCL 05
  012 XEQ PROMPT
  013 x = 0?
  014 GTO 01
  015 FS? 01
  016 XEQ SQ Y
  017 ST+ 06
  018 GTO 00
* 019 LBL 01
  020 1
  021 ST- 05
  022 RCL 05
  023 ST/ 06
  024 RCL 06
  025 RCL 22
  026 -
  027 RCL 20
  028 /
  029 FS? 00
  030 10^x
  031 STO 07
  032 FIX 4
  033 KONZ =
  034 ARCL 07
  035 XEQ ANZ
  036 RTN
* 037 LBL 02
  038 RCL 00
  039 x^2
  040 RCL 07
  041 FS? 00
  042 LOG
  043 x^2
  044 *
  045 RCL 01
  046 x^2
  047 RCL 32
  048 +
  049 +
  050 RCL 20
  051 x^2
  052 1/x
  053 *
  054 SQRT
  055 FS? 00
  056 10^x
  057 STO 08
  058 M =
  059 ARCL 08
  060 XEQ ANZ
  061 RTN
  062 RCL 07
  063 RCL 08
  064 -
  065 STO 09
  066 M1 =
  067 ARCL 09
  068 XEQ ANZ
  069 RTN
  070 RCL 07
  071 RCL 08
  072 +
  073 STO 10
  074 M2 =
  075 ARCL 10
  076 XEQ ANZ
  077 RTN
* 078 LBL 03
  079 T = ?
  080 XEQ ANZ
  081 XEQ PROMPT
  082 STO 02
  083 RCL 02
  084 x^2
  085 RCL 32
  086 RCL 47
  087 /
  088 *
  089 RCL 20
  090 x^2
  091 x<>y
  092 -
  093 STO 03
  094 RCL 20
  095 RCL 06
  096 RCL 26
  097 -
  098 *
  099 RCL 03
  100 /
  101 RCL 15
  102 +
  103 STO 04
* 104 LBL 04
  105 RCL 03
```

```
106 RCL 05
107 RCL 14
108 +
109 *
110 RCL 05
111 RCL 14
112 *
113 /
114 RCL 06
115 RCL 26
116 -
117 x^2
118 RCL 47
119 /
120 +
121 SQRT
122 RCL 02
123 RCL 32
124 SQRT
125 RCL 03
126 /
127 *
128 *
129 STO 09
130 RCL 04
131 RCL 09
132 -
133 FS? 00
134 10^x
135 STO 10
136 L1 =
137 ARCL 10
138 XEQ ANZ
139 RTN
140 RCL 04
141 RCL 09
142 +
143 FS? 00
144 10^x
145 STO 11
146 L2 =
147 ARCL 11
148 XEQ ANZ
149 RTN
* 150 LBL 05
151 RCL 06
152 RCL 26
153 -
154 RCL 20
155 /
156 RCL 15
157 +
158 RCL 07
159 -
160 FS? 00
161 10^x
162 STO 12
163 D =
164 ARCL 12
165 XEQ ANZ
166 RTN
167 RCL 10
168 RCL 07
169 -
170 FS? 00
171 10^x
172 STO 00
173 D1 =
174 ARCL 00
175 XEQ ANZ
176 RTN
177 RCL 11
178 RCL 07
179 -
180 FS? 00
181 10^x
182 STO 01
183 D2 =
184 ARCL 01
185 XEQ ANZ
186 END
```

Datenspeicherverteilung im Programm KONZ

R 00: Fehler bei b (s_b) - später mit D_1 belegt
R 01: Fehler bei a (s_a) - später mit D_2 belegt
R 02: t-Wert aus der Student-Verteilung
R 03: $(b^2 - t^2 \cdot s^2_{y \cdot x}/SQ_x) = B$
R 04: $(x_S + b(y_P - y_S)/B) = G$
R 05: n_P
R 06: y_P bzw. y_P
R 07: x_P
R 08: $m_{x_P} = M$
R 09: M_1, später mit $t \cdot s_{y \cdot x}((B(n_P + n_S)/n_P n_S)) + (y_P - y_S)^2/SQ_x)^{0.5}$
= H·B belegt
R 10: M_2, später mit $L_{x_{1P}}$ = L1 belegt
R 11: speichert $L_{x_{2P}}$ = L2
R 12: speichert D

Programmiert wurden die Formeln:

$$L_{x_{1P}} = G - H$$

$$L_{x_{2P}} = G + H$$

$$D_1 = G - H - x_P$$

$$D_2 = G + H - x_P$$

Zu Programm 4 (KONF b): Mit dem Programm KONF b werden die Vertrauensbereiche für die Kurvenparameter b (Regressionskoeffizient) und a (Achsenabschnitt) auf einem zuvor gewählten Wahrscheinlichkeitsniveau (siehe SBR GAMMA) ermittelt. Der Rechner fordert zur Eingabe der gewählten Konfidenzzahl γ auf und zeigt dann die untere und obere Grenze für β und α an.

Programmauflistung zu KONF b

```
001 LBL KONF b
002 002.012
003 XEQ LOE
004 XEQ GAMMA
005 STO 03
006 RCL 21
007 SQRT
008 RCL 03
009 *
010 RCL 17
011 1/x
012 RCL 14
013 2
014 -
015 *
016 RCL 18
017 *
018 SQRT
019 STO 04
020 ·/·
021 STO 05
022 KONF =
023 ARCL 05
024 XEQ ANZ
025 RCL 20
026 RCL 05
027 -
028 STO 06
029 b - L =
030 ARCL 06
031 XEQ ANZ
032 RTN
033 RCL 20
034 RCL 05
035 +
036 STO 07
037 b + L =
038 ARCL 07
039 XEQ ANZ
040 RTN
041 KONF a
042 XEQ ANZ
043 RCL 18
044 1/x
045 RCL 17
046 RCL 15
047 x²
048 *
049 *
050 RCL 14
051 1/x
052 +
053 RCL 21
054 RCL 14
055 2
056 -
057 ·/·
058 *
059 SQRT
060 RCL 03
061 *
062 STO 08
063 KONF =
064 ARCL 08
065 XEQ ANZ
066 RCL 22
067 RCL 08
068 -
069 STO 09
070 a - L =
071 ARCL 09
072 XEQ ANZ
073 RTN
074 RCL 22
075 RCL 08
076 +
077 STO 10
078 a + L =
079 ARCL 10
080 XEQ ANZ
081 END
```

Zu Programm 5 (TEST b): Das Programm "Test beim Regressionskoeffizienten" prüft, ob β von Null verschieden ist. Mit diesem Entscheidungstest wird entschieden, ob Y von X abhängt. TEST b kann nur in Verbindung mit KONF b durchgeführt werden, da die Speicherinhalte von R 03 und R 04 aus KONF b hier erneut verwendet werden.

```
001 LBL TEST b
002 TEST b
003 XEQ ANZ
004 008.012
005 XEQ LOE
006 BERECHNE T
007 XEQ ANZ
008 RCL 20
009 RCL 21
010 SQRT
011 ·/·
012 RCL 04
013 *
014 STO 08
015 T =
016 ARCL 08
017 XEQ ANZ
018 RTN
019 RCL 03
020 RCL 08
021 x ≦ y?
022 GTO 00
023 BETA ≠ 0
024 XEQ ANZ
025 RTN
026 LBL 00
027 BETA = 0
028 XEQ ANZ
029 END
```

Zu Programm 6 (KONF MY): Das Programm berechnet Konfidenzinterintervalle ($y_m - l_m$, $y_m + l_m$) für den Mittelwert μ zu vorgegebenen, beliebigen Konzentrationswerten x_m.

```
001 LBL KONF MY
002 KONF MY
003 XEQ ANZ
004 005.012
005 XEQ LOE
006 XEQ GAMMA
007 STO 05
008 LBL 00
009 KONZ
010 PROMPT
011 FS? 00
012 LOG
013 STO 06
014 RCL 06
015 RCL 15
016 -
017 x^2
018 RCL 17
019 *
020 RCL 18
021 ·/·
022 RCL 14
023 1/x
024 +
025 RCL 21
026 *
027 RCL 14
028 2
029 -
030 ·/·
031 SQRT
032 RCL 05
033 *
034 STO 07
035 L =
036 ARCL 07
037 XEQ ANZ
038 RCL 06
039 RCL 20
040 *
041 RCL 22
042 +
043 STO 08
044 Y =
045 ARCL 08
046 XEQ ANZ
047 RTN
048 RCL 08
049 RCL 07
050 -
051 STO 09
052 Y - L =
053 ARCL 09
054 XEQ ANZ
055 RTN
056 RCL 08
057 RCL 07
058 +
059 STO 10
060 Y + L =
061 ARCL 10
062 XEQ ANZ
063 RTN
064 GTO 00
065 END
```

Zu Programm 7 (TEST LIN): TEST LIN ist ein F-verteilter Test zur Oberprüfung der Regression auf Linearität. Der Prüffaktor v wird bereits in LINREG berechnet und in R 33 gespeichert.

```
001 LBL TESTLIN
002 TEST LIN
003 XEQ ANZ
004 LBL 00
005 c = ?
006 PROMPT
007 ENTER
008 RCL 33
009 x = y?
010 GTO 01
011 NICHT LIN
012 XEQ ANZ
013 RTN
014 LBL 01
015 LINEAR
016 XEQ ANZ
017 END
```

Zu Programm 8 (TESTPAR): TEST PAR ist ein t-verteilter Test zur Oberprüfung zweier Regressionen auf Gleichheit (= Parallelitätstest).

```
001 LBL TESTPAR
002 TEST PAR
003 XEQ ANZ
004 005.012
005 XEQ LOE
006 40.04101
007 STO 05
008 43.04501
009 STO 06
010 35.03701
011 STO 07
012 47.04901
013 STO 08
* 014 LBL 00
015 RCL 39
016 ST- IND 05
017 XEQ ABS
018 ISG 05
019 GTO 00
* 020 LBL 01
021 2
022 ST- IND 06
023 ISG 06
024 GTO 01
* 025 LBL 02
026 43.04501
027 STO 06
* 028 LBL 03
029 RCL IND 06
030 ST* IND 07
031 1
032 ST+ 06
033 ISG 07
034 GTO 03
* 035 LBL 04
036 44.04501
037 STO 06
* 038 LBL 05
039 RCL 43
040 ST+ IND 06
041 ISG 06
042 GTO 05
* 043 LBL 06
044 36.03701
045 STO 07
046 44.04501
047 STO 06
* 048 LBL 07
049 RCL 35
050 ST+ IND 07
051 RCL IND 06
052 ST/ IND 07
053 1
054 ST+ 06
055 ISG 07
056 GTO 07
057 RCL 49
058 x = 0?
059 GTO 19
* 060 LBL 08
061 RCL IND 08
062 1/x
063 STO IND 08
064 ISG 08
065 GTO 08
* 066 LBL 09
067 48.04901
068 STO 08
* 069 LBL 10
070 RCL 47
071 ST+ IND 08
072 ISG 08
073 GTO 10
* 074 LBL 11
075 36.03701
076 STO 07
077 40.04101
078 STO 05
079 48.04901
080 STO 08
* 081 LBL 12
082 RCL IND 07
083 ST* IND 08
084 1
085 ST+ 07
086 ISG 08
087 GTO 12
* 088 LBL 13
089 48.04901
090 STO 08
* 091 LBL 14
092 RCL IND 08
093 SQRT
094 ST/ IND 05
095 1
096 ST+ 08
097 ISG 05
098 GTO 14
* 099 LBL 15
100 40.04101
101 STO 05
102 40.04001
103 STO 09
* 104 LBL 16
105 T =
106 ARCL IND 05
107 RCL IND 05
108 XEQ ABS
109 XEQ PROMPT
110 x > y?
111 GTO 17
```

```
  112 UNPARALLEL      122 ISG 50          132 STO 08
  113 XEQ ANZ         123 GTO 20          133 GTO 08
  114 RTN             124 GTO 21        * 134 LBL 20
  115 ISG 50        * 125 LBL 18          135 ISG 09
  116 GTO 20          126 ENDE            136 GTO 16
  117 GTO 21          127 XEQ ANZ         137 GTO 18
* 118 LBL 17          128 RTN           * 138 LBL 21
  119 PARALLEL        129 GTO 18          139 ISG 05
  120 XEQ ANZ       * 130 LBL 19          140 GTO 16
  121 RTN             131 47.04801        141 GTO 18
                                          142 END
```

Die für den Parallelitätstest erforderlichen Kenndaten n, b, $s^2_{y \cdot x}$ und SQ_x werden im Programm LINREG für drei Regressionen nacheinander in Datenspeicherblöcken indirekt abgespeichert. Das Programm TESTPAR verarbeitet diese Kenndaten bis zur Prüfgröße t_{PAR}. Diese wird angezeigt und mit dem entsprechenden Tabellenwert c der t-Verteilung verglichen. Die Testentscheidung wird durch "PARALLEL" oder "UNPARALLEL" angegeben.
Der Rechner vergleicht die zuerst eingegebene Regression jeweils mit den beiden nachfolgend eingegebenen.
Die Inhalte der Datenspeicher R 34 bis R 50 werden am Ende von TESTPAR gelöscht.

Zu Programm DIFF T (Diffenrenzen-t-Test): Der Differenzen-t-Test ist ein modifizierter t-Test zum objektiven Vergleich von Mittelwerten aus parallelen Meßdatenpaaren (3, 16). Mit ihm lassen sich Unterschiede zwischen Meßwerten aus unterschiedlich behandelten, aber gleichartigen Proben aufdecken. Wegen der Verarbeitung zusammengehörender, paralleler Einzeldaten gilt, daß $n_A = n_B = n$ ist und da hier geprüft werden soll, ob die Differenz $(\bar{x}_A - \bar{x}_B)$ von null signifikant verschieden ist, vereinfacht sich die ursprüngliche Formel

$$TAU = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{\frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{n_A + n_B - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}} \qquad (1)$$

zu

$$TAU = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (\Delta x_i - \Delta \bar{x})^2}} \cdot \sqrt{n} \qquad (2)$$

Im Programm DIFF-T wird der Prüffaktor TAU nach Formel (2) berechnet. TAU wird mit dem t-Wert aus der t-Tabelle bei einem gewählten Signifikanzniveau α und n-1 Freiheitsgraden verglichen. Für TAU $\leqq$ t gilt, daß kein signifikanter Unterschied zwischen $\bar{x}_A$ und $\bar{x}_B$ besteht bzw. die Differenz $(\bar{x}_A - \bar{x}_B)$ nicht signifikant verschieden von null ist.

Programmauflistung zu Pgm DIFF T

```
001  LBL DIFF T      024  RCL 03      047  RCL 00
002  DIFF T          025  -           048  /
003  XEQ ANZ         026  ST+ 05      049  STO 08
004  XEQ CLRG        027  x^2         050  RCL 04
005  LBL 00          028  ST+ 06      051  RCL 00
006  1               029  GTO 00      052  /
007  ST+ 00          030  LBL 01      053  STO 09
008  FIX 0           031  1           054  RCL 08
009  WERT A          032  ST- 00      055  RCL 09
010  ARCL 00         033  RCL 06      056  -
011  XEQ ANZ         034  RCL 05      057  RCL 07
012  XEQ PROMPT      035  x^2         058  /
013  x = 0?          036  RCL 00      059  RCL 00
014  GTO 01          037  /           060  SQRT
015  STO 01          038  -           061  *
016  ST+ 02          039  RCL 00      062  XEQ ABS
017  WERT B          040  1           063  STO 10
018  ARCL 00         041  -           064  FIX 4
019  XEQ ANZ         042  1/x         065  TAU=
020  XEQ PROMPT      043  *           066  ARCL 10
021  STO 03          044  SQRT        067  XEQ ANZ
022  ST+ 04          045  STO 07      068  END
023  RCL 01          046  RCL 02
```

Programmschlüssel zu Pgm DIFF T — Anzei

1. Eingabe des Meßwertes x_1 der Vergleichsdatengruppe A — WERT
   Drücke RUN (R/S)
2. Eingabe des Meßwertes x_1 der Vergleichsdatengruppe B — WERT
   Drücke RUN (R/S)
   Der Rechner springt an den Anfang des Programms und fordert zur Eingabe der weiteren parallelen Daten aus den zu vergleichenden Gruppen A und B auf. Sind sämtliche parallelen Daten eingegeben, so gebe
3. null ein.
   In der Anzeige erscheint die berechnete Prüfgröße — TAU=

Anhang II (Herstellung der Eichprobenkonzentrationen)

Verdünnungsreihe der Gentamicin-Charge I, Einwaage 100000 µg Base

Die Auflösung der Trockensubstanz erfolgte im Verpackungsfläschchen mit Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,8. Die hieraus resultierende Lösung Nr. 1 wurde für die Herstellung aller weiteren Gentamicin-Lösungen verwendet. Als Verdünnungslösung diente dann eigenaktivitätsfreies Poolserum.

Lösung	eingesetzte Volumina	verwendete Pipetten	resultierende fiktive Konz. (in ug/ml)
Nr. 1	10 ml Phosphatpuffer	1x10	10000
Nr. 2	2 ml Lsg 1 + 8 ml Pools.	1x2, 1x10, 1x-2	2000
Nr. 3	2 ml Lsg 2 + 98 ml Pools.	1x2, 2x50, 1x-2	40
Nr. 4	50 ml Lsg 3 + 50 ml Pools.	2x50	20
Nr. 5	50 ml Lsg 4 + 50 ml Pools.	2x50	10
Nr. 6	50 ml Lsg 5 + 50 ml Pools.	2x50	5
Nr. 7	50 ml Lsg 6 + 50 ml Pools.	2x50	2,5
Nr. 8	50 ml Lsg 7 + 50 ml Pools.	2x50	1,25
Nr. 9	50 ml Lsg 8 + 50 ml Pools.	2x50	0,625
Nr.10	50 ml Lsg 9 + 50 ml Pools.	2x50	0,312

Hinweis: 1x2, 1x10, 1x-2 bedeuten: Es wurden 10 ml Lösung vorgelegt (= 1x10), davon 2 ml abgesaugt (= 1x-2). Zu diesen verbleibenden 8 ml wurden 2 ml einer anderen Lösung (= 1x2) hinzupipettiert: Es resultieren 10 ml der neuen Lösung.

Anhang II (Herstellung der Eichprobenkonzentrationen)

Verdünnungsreihe der Gentamicin-Charge II, Einwaage 100000 µg Ba

Die Auflösung der Trockensubstanz (enthält 100000 ug aktive Gent
micin-Base) erfolgte im Verpackungsfläschchen mit Phosphatpuffer
nach Sörensen, pH 7,8. Die hieraus resultierende Lösung Nr. 1 wu
für die Herstellung der nächsten Gentamicin-Lösung verwendet. Al
Verdünnungslösung diente dann eigenaktivitätsfreies Poolserum.

Lösung	eingesetzte Volumina	verwendete Pipetten	resultiere fiktive Ko (in ug/m
Nr. 1	10 ml Phosphatpuffer	1x10	10000
Nr. 2	8 ml Lsg 1 + 2 ml Pools.	1x10, 1x-2, 1x2	8000
Nr. 3	4 ml Lsg 2 + 6 ml Pools.	2x2, 1x6	3200
Nr. 4	1 ml Lsg 3 + 99 ml Pools.	1x1, 2x50, 1x-1	32
Nr. 5	50 ml Lsg 4 + 50 ml Pools.	2x50	16
Nr. 6	50 ml Lsg 5 + 50 ml Pools.	2x50	8
Nr. 7	50 ml Lsg 6 + 50 ml Pools.	2x50	4
Nr. 8	50 ml Lsg 7 + 50 ml Pools.	2x50	2
Nr. 9	50 ml Lsg 8 + 50 ml Pools.	2x50	1
Nr. 10	50 ml Lsg 9 + 50 ml Pools.	2x50	0,
Nr. 11	50 ml Lsg 10 + 50 ml Pools.	2x50	0,

Anhang II (Herstellung der Eichprobenkonzentrationen)

Verdünnungsreihe der Gentamicin-Charge III, Einwaage 100000 µg Base

Die Auflösung der Trockensubstanz (enthält 100000 ug aktive Gentamicin-Base) erfolgte im Verpackungsfläschchen mit Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,8. Die hieraus resultierende Lösung Nr. 1 wurde für die Herstellung der nächsten Gentamicin-Lösung verwendet. Als Verdünnungslösung diente dann eigenaktivitätsfreies Poolserum.

Lösung	eingesetzte Volumina	verwendete Pipetten	resultierende fiktive Konz. (in ug/ml)
Nr. 1	10 ml Phosphatpuffer	1x10	10000
Nr. 2	6 ml Lsg 1 + 4 ml Pools.	1x6, 2x2	6000
Nr. 3	2 ml Lsg 2 + 8 ml Pools.	1x2, 1x10, 1x-2	1200
Nr. 4	1 ml Lsg 3 + 99 ml Pools.	1x1, 2x50, 1x-1	12
Nr. 5	50 ml Lsg 4 + 50 ml Pools.	2x50	6
Nr. 6	50 ml Lsg 5 + 50 ml Pools.	2x50	3
Nr. 7	50 ml Lsg 6 + 50 ml Pools.	2x50	1,5
Nr. 8	50 ml Lsg 7 + 50 ml Pools.	2x50	0,75

Hinweis: Der mittlere Fehler bei den eingesetzten Vollpipetten wurde für das Volumen 1 ml mit 0,010 ml,
für das Volumen 2 ml mit 0,014 ml,
für das Volumen 6 ml mit 0,060 ml,
für das Volumen 10 ml mit 0,045 ml und
für das Volumen 50 ml mit 0,033 ml geschätzt.
(Jeweils 10 Massenwägungen mit Aqua dest.)

9. Literaturverzeichnis

1. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E., FLETCHER, C. M., GARDNER, A. D. HATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., FLOREY, H. W.: Further observations on penicillin. Lancet 2, 177 - 189 (1941)

2. ANDERSEN, A., ZIRPEL, M.: Die Programmierpraxis der technischen-naturwissenschaftlichen Taschenrechner. Franzis, München (1984)

2a. BLISS, C. I.: Statistics in biology. Vol. 1. McGraw-Hill, New York-San Francisco-Toronto-London (1967)

3. BOSCH, K.: Elementare Einführung in die angewandte Statistik. Vieweg, Braunschweig (1982)

4. CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie - Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Fischer, Stuttgart (1974)

5. COOPER, K. E., WOODMAN, D.: The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. J. Path. Bact. 58, 75 - 84 (1946)

6. COOPER, K. E.: Note on the theory of inhibition zones. J. Gen. Microbiol. 7, 13 (1952)

7. COOPER, K. E., GILLESPIE, W. A.: The influence of temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. J. Gen. Microbiol. 7, 1 - 7 (1952)

8. COOPER, K. E., LINTON, A. H.: The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assays. J. Gen. Microbiol. 7, 8 - 17 (1952)

9. COOPER, K. E.: Theory of antibiotic inhibition zones in agar media. Nature 176, 510 - 511 (1955)

10. DALLMANN, H. ELSTER, K.-H.: Einführung in die höhere Mathematik, Band 1. Vieweg, Braunschweig (1968)

11. DEACON, S.: Factors affecting the assay of gentamicin by the plate diffusion method. J. clin. Path. 29, 54 - 57 (1976)

12. DIEM, K., LENTNER, C.: Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy. Thieme, Stuttgart (1975)

13. GOSMANN, K.-H.: Anwenderhandbuch HP-41C/CV. Vieweg, Braunschweig (1983)

14. HUMPHREY, J. H., LIGHTBOWN, J. W.: A general theory for plate assay of antibiotics with some practical applications. J. Gen. Microbiol. 7, 129 - 143 (1952)

15. INSTAND-Ringversuche: Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e. V., Postfach 4402, D-4000 Düsseldorf 1 (1983)

15a. JESDINSKY, H. J. in: Merten, R., von Boroviczény, K.-G., Haëckel, R. (Hrsg.): Methoden-, Reagenzien- und Geräte-Evaluation in der Laboratoriumsmedizin. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo (1985)

16. KAISER, R., GOTTSCHALK, G.: Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten. Bibliographisches Institut, Mannheim-Wien-Zürich (1972)

17. KLEIN, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer, Berlin-Göttingen- Heidelberg (1957)

18. KONDO, S.: Punch hole method. A simplified bio-assay technique of antibiotic concentrations. In WILLIAMS, J.D., GEDDES, A. M. (Eds.): Chemotherapy - Proceedings of the 9th International Congress of Chemotherapy, London 1975. 2, 155 - 158. Plenum, New York-London (1976)

19. KREYSZIG, E.: Statistische Methoden und ihre Anwendungen. Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen (1977)

19a. LINDER, A.: Statistische Methoden, 4. Aufl. Birkhäuser, Basel (1964)

19b. LINDER, A., BERCHTOLD, W.: Statistische Methoden II, Birkhäuser Verlag, (UTB 1110), Basel (1982)

20. LOCHMANN, G.: Nomografie. In OSE, G., SCHIEMANN, G., BAUMANN, H., STOPP, F., KÖRNER, W., LOCHMANN, G.: Lehr- und Obungsbuch Mathematik, Band 4, 515 - 642, Deutsch, Thun-Frankfurt/Main (1981)

21. de LOUVOIS, J.: Factors influencing the assay of antimicrobial drugs in clinical samples by the agar plate diffusion method. J. Antimicrob. Chemother. 9, 253 - 265 (1982)

22. MITCHISON, D. A., SPICER, C. C.: A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. J. Gen. Microbiol. 3, 184 - 203 (1948)

23. OTTEN, H., PLEMPEL, M., SIEGENTHALER, W.: Antibiotika-Fibel, S. 373. Thieme, Stuttgart (1975)

24. REEVES, D. S., BYWATER, M. J.: Quality control of serum gentamicin assays - experience of national surveys. J. Antimicrob. Chemother. 1, 103 - 116 (1975)

25. RENSHAW, S., CORNERE, B.: The effect of bilirubin on the assay of gentamicin. J. clin. Path. 27, 445 - 446 (1974)

26. RIEDWYL, H.: Regressionsgrade und Verwandtes. Uni-Taschenbücher 923. Haupt, Bern-Stuttgart (1980)

27. Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde. Dtsch. Ärzteblatt 68, 2228 - 2231 (1971)

28. ROSIN, H., HAGEDORN, H.-J., KÖHLER, M., THOMAS, L.: Agardiffusionsmethode - Rundtischgespräch über Methoden und Indikationen für Blutspiegelbestimmungen von Aminoglykosiden. Infection 5, 51 - 54 (1977)

29. SHANSON, D. C., DANIELS, J. V.: Factors affecting plate assay of gentamicin, I. Diluents. J. Antimicrob. Chemother. 1, 219 - 227 (1975)

30. SHANSON, D. C., HINCE, C., DANIELS, J. V.: Assay of gentamicin and tobramycin by a reliable 2 1/2 hour Klebsiella plate method. In WILLIAMS, J. D., GEDDES, A. M. (Eds.): Chemotherapy - Proceedings of the 9th International Congress of Chemotherapy, London 1975. 2, 147 - 153. Plenum, New York- London (1976)

31. SHANSON, D. C., HINCE, C. J.: Factors affecting plate assay of gentamicin, II. Media. J. Antimicrob. Chemother. 3, 17 - 23 (1977)

32. VESTERDAL, J.: Studies on the inhibition zones observed in the agar cup method for penicillin assay. J. Acta Path. Scand. 24, 272 - 282 (1947)

33. WASHINGTON II, J. A., MODR, Z. ERICSSON, H., LANDON, J., WATSON, R. A. A., ANHALT, J. P., YOURASSOWSKY, E.: Assay techniques. In Current Chemotherapy - Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy, Zürich 1977. 1, 56 - 59. ASM (1978)

Lebenslauf

Name:		Lutz Dieter Thomas
Geboren:		25. Juli 1947
Eltern:		Georg Thomas
		Maria Thomas, geb. Degen
Konfession:		röm.-kath.
Schul- und Berufsausbildung	1954 - 1962	Volksschule
	1962 - 1964	Städt. zweijährige Handelsschule
	1964 - 1966	kaufmännische Lehre
	1966 - 1972	Beamter auf Widerruf bei der Stadtverwaltung Düsseldorf
dazwischen	1969 - 1970	18monatiger Wehrdienst
	1970 - 1973	Abendgymnasium Köln und Düsseldorf
	1973 - 1975	Biologiestudium an der Universität Köln
	1975 - 1981	Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
	Mai 1981	Drittes Ärztliches Staatsexamen sowie
	Juni 1981	Erteilung der Ärztlichen Approbation
	1981 - 1982	Assistenzarzt im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf
	1982 - 1983	Assistenzarzt an der Kinderklinik der Universität Düsseldorf
	seit 1983	wieder am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf

Zusammenfassung

Die mikrobiologische Bestimmung von Antibiotikakonzentrationen mit Hilfe der Agardiffusionsmethode (ADM) gilt als traditionelles Referenzverfahren. Allerdings wurde in Studien in England und den USA festgestellt, daß die praktische Anwendung dieser Methode in vielen Laboratorien zu erheblichen Fehlbestimmungen führt.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb verschiedene Einflüsse auf die resultierenden Meßergebnisse untersucht. U. a. zeigt sich, daß weder der pH-Wert des Lösungsmittels (Poolserum) noch Bilirubinkonzentrationen bis 140 mg/l Serum einen signifikant meßbaren Einfluß auf die Gentamicinaktivität haben.

Aus den eigenen Ergebnissen und der Diskussion von Angaben im Schrifttum werden Empfehlungen für eine standardisierte Durchführung der ADM abgeleitet. Mit Hilfe der angewandten Fehlerrechnung und statistischer Methoden wird die Zuverlässigkeit der ADM beurteilt, wenn sie unter solchen standardisierten Bedingungen angewandt wird. Bei sorgfältiger Durchführung der Methode ist der mittlere fortgepflanzte Fehler bei der Herstellung der Eichprobenkonzentrationen nicht größer als 1 %. Die mittleren Fehler bei der Konzentrationsbestimmung einer Serumprobe sind nicht größer als 10 %. Geeignete Kontrollmaßnahmen für die routinemäßige Konzentrationsbestimmung von Antibiotika werden empfohlen. Ein Modell zur statistischen Qualitätskontrolle solcher Untersuchungen wird vorgestellt. Es kann auch für die Durchführung von nationalen oder internationalen Ringversuchen nützlich sein.

(Prof. Dr. med. H. Rosin)
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Virologie der Universität Düsseldorf